

Molekulare Analyse des cdk1/CCNB1 Komplexes und Charakterisierung von cdk-Inhibitoren im Neuroblastom

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Melanie Schwermer (geb. Heilmann)
aus Herten

Oktober 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am hämatologisch-onkologischen Labor der Kinderklinik III am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Alexander Schramm

2. Gutachter: Prof. Dr. Shirley Knauer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.14

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | VIII |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | X |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Neuroblastom | 1 |
| 1.1.1 Stadieneinteilung | 1 |
| 1.1.2 Genetische Marker beim Neuroblastom | 2 |
| 1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Neuroblastom | 3 |
| 1.2 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen | 5 |
| 1.2.1 Rolle von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen bei Krebserkrankungen | 7 |
| 1.2.2 Inhibition von cdks als therapeutische Option | 7 |
| 1.2.2.1 Cdk-Inhibition im Neuroblastom | 8 |
| 2. ZIELSETZUNG | 10 |
| 3. MATERIAL | 11 |
| 3.1 Geräte | 11 |
| 3.2 Verbrauchsmaterialien | 12 |
| 3.3 Chemikalien, Puffer, Medien | 13 |
| 3.4 Kits | 15 |
| 3.5 Inhibitoren | 15 |
| 3.6 Enzyme | 15 |
| 3.7 Antikörper | 16 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 3.8 Primer | 17 |
| 3.9 siRNAs | 17 |
| 3.10 Zelllinien | 18 |
| 3.11 Verwendete Puffer und Lösungen | 18 |
| 3.11.1 Zellkultur | 18 |
| 3.11.2 Proliferations Assay | 19 |
| 3.11.3 Zellyse | 20 |
| 3.11.4 SDS PAGE | 20 |
| 3.11.4 Western Blot | 21 |
| 3.11.5 PCR | 22 |
| 3.11.6 Immunozytochemie | 23 |
| 4. METHODEN | 24 |
| 4.1 Exon Array Studien primärer Neuroblastome | 24 |
| 4.2 Zellkultur | 24 |
| 4.2.1 Auftauen und Einfrieren von humanen Neuroblastomzellen | 24 |
| 4.2.2 Passagierung von kultivierten Zellen | 25 |
| 4.2.3 Induktion von 4- Hydroxytamoxifen induzierbaren Zellen | 25 |
| 4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) | 26 |
| 4.3.1 Gesamt RNA Isolierung aus Tumorzellen | 26 |
| 4.3.2 Synthese komplementärer DNA (cDNA) | 26 |
| 4.3.3 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) | 26 |
| 4.3.3.1 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen | 27 |
| 4.3.3.2 Agarose Gelelektrophorese | 29 |
| 4.3.4 Quantitative Real-Time-PCR | 29 |
| 4.4 Nachweis der Zellviabilität im MTT-Assay | 29 |
| 4.4.1 Bestimmung der Zellzahl | 30 |
| 4.4.2 Bestimmung des IC50-Wertes | 30 |
| 4.5 Knock-down endogener RNAs durch siRNA Transfektion | 30 |
| 4.6 FACS basierte Zellzyklusanalyse | 31 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 4.7 Immunodetektion von Proteinen | 32 |
| 4.7.1 Zellyse | 32 |
| 4.7.2 Proteinbestimmung | 32 |
| 4.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 33 |
| 4.7.4 Western Blot | 34 |
| 4.7.5 Ponceau Färbung | 34 |
| 4.8 Immunozytochemische Färbung | 35 |
| 4.9 Nachweis des Zelltodes mittels eines photometrisch basierten Assays | 35 |
| 4.10 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität | 35 |
| 4.11 Bestimmung der Caspase-8 und -9 Aktivität | 36 |
| 4.12 Blockierung der RO3306 vermittelten Apoptose durch Inhibition von Caspasen | 36 |
| 4.13 Kombinationstherapie aus cdk-und ALK-Inhibitoren | 36 |
| 4.14 Statistische Auswertungen | 38 |
| 5. ERGEBNISSE | 39 |
| 5.1. Korrelation zwischen der cdk- bzw. Cyclin-Expression und dem Verlauf der Krankheit sowie dem MYCN-Status | 39 |
| 5.2 Expression von cdk1 und CCNB1 in NB Zelllinien | 41 |
| 5.3 Lokalisation von CCNB1 bzw. cdk1 mittels immunozytochemischer Untersuchungen | 42 |
| 5.4 Charakterisierung des siRNA vermittelten Knock-downs von cdk1 bzw. CCNB1 | 44 |
| 5.4.1 Knock-down Effizienz | 44 |
| 5.4.2 Einfluss des cdk1/CCNB1 Knock-downs auf die Zellviabilität | 45 |
| 5.5 Charakterisierung der molekularen Wirkung von cdk-Inhibitoren (R03306 und JNJ-7706621) in Neuroblastomzelllinien | 46 |
| 5.5.1 Einfluss von cdk-Inhibitoren auf die Proliferation von NB Zellen | 46 |
| 5.5.1.1 Einfluss des cdk1 Inhibitors, RO3306, auf die Zellviabilität | 47 |
| 5.5.1.2 Einfluss des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621, auf die Zellviabilität | 47 |
| 5.5.2 Nachweis der spezifischen cdk1 Inhibition durch RO3306 | 49 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 5.5.3 Einfluss des p53 Status auf die inhibitorische Effizienz der cdk-Inhibitoren | 50 |
| 5.5.3.1 Charakterisierung der p53 knock-down Zellen | 50 |
| 5.5.3.2 Einfluss von p53 auf die Inhibitor Effizienz von cdk-Inhibitoren | 52 |
| 5.5.4 Einfluss von cdk Inhibitoren auf den Zellzyklus | 54 |
| 5.5.4.1 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO-3306, auf den Zellzyklus | 54 |
| 5.5.4.2 Einfluss des pan cdk Inhibitors, JNJ-7706621, auf den Zellzyklus | 55 |
| 5.5.4.3 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO3306, auf p53 knock-down Zellen | 56 |
| 5.5.5 Nachweis von Apoptose durch die Inhibition von cdk1 durch RO3306 | 58 |
| 5.5.6 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO3306, auf die mitochondriale Aktivität | 58 |
| 5.5.7 Rollen von Caspasen in der von RO3306 vermittelten Apoptose | 59 |
| 5.5.7.1 Überprüfung der Caspase mRNA-Level | 59 |
| 5.5.7.2 Nachweis der Caspase-8 und -9 Aktivierung durch die Inhibition von cdk1 | 60 |
| 5.5.7.3 Beteiligung von Caspasen an der RO3306 vermittelten Apoptose | 61 |
| <i>Nachweise der Apoptose nach RO3306 Behandlung und Inhibition der Caspase Aktivität</i> | 61 |
| <i>Untersuchung des Zellzyklus nach RO3306 Behandlung und Inhibition der Caspase-Aktivität</i> | 62 |
| 5.5.8 Nachweis der Aktivierung des p53 Signalweges nach Inhibition von cdk1 | 64 |
| 5.6 Duale Inhibition von cdk1 und ALK | 65 |
| 5.6.1 Simultane Kombinationstherapie | 65 |
| 5.6.1.1 Simultane Behandlung von Neuroblastomzellen mit RO3306 und ALK-Inhibitoren | 65 |
| 5.6.1.2 Simultane Behandlung von Neuroblastomzellen mit JNJ-7706621 und ALK-Inhibitoren | 67 |
| 5.6.2 Sukzessive Kombinationstherapie mit ALK- und cdk-Inhibitoren | 69 |
| 5.6.2.1 cdk Inhibition mit anschließender ALK-Inhibition | 69 |
| <i>RO3306 Behandlung mit anschließender ALK Inhibition</i> | 69 |
| <i>JNJ-7706621 Behandlung mit anschließender ALK Inhibition</i> | 71 |
| 5.6.2.2 ALK-Inhibition und anschließende cdk1-Inhibition | 72 |
| <i>ALK-Inhibition mit anschließender RO3306 Behandlung</i> | 72 |
| <i>ALK Inhibition mit anschließender JNJ-7706621 Behandlung</i> | 74 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 6.DISKUSSION | 76 |
| 6.1 Bedeutung von Zellzyklusregulatoren wie cdks und Cycline im Neuroblastom | 76 |
| 6.2 siRNA vermittelte Herunterregulation der cdk1- bzw. CCNB1-Expression im Neuroblastom | 78 |
| 6.3 Pharmakologische Inhibition von cdks, insbesondere von cdk1, im Neuroblastom | 79 |
| 6.4 Rolle des p53-Status bei der cdk1 Inhibition | 80 |
| 6.5 Wirkung von Cdk-Inhibitoren in Kombination mit ALK-Inhibitoren | 82 |
| 7. ZUSAMMENFASSUNG | 84 |
| 8. SUMMARY | 85 |
| 9. LITERATURVERZEICHNIS | 86 |
| 10. ANHANG | 96 |
| 10.1 Danksagung | 96 |
| 10.2 Publikationen | 97 |
| 10.2 Lebenslauf | 98 |
| 10.3 Erklärungen | 99 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| 4-OHT | 4-Hydroxytamoxifen |
| ALK | Anaplastische Lymphom Kinase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| bp | Basenpaare |
| CCN | Cyclin |
| Cdk | Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase) |
| cDNA | komplementäre DNA (copy DNA) |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid) |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzymgebundener Immunabsorption Assay (enzyme linked immunosorbent assay) |
| FCS | Fötales Kälberserum (fetal calf serum) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HRP | Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase) |
| IC50 | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| kDa | Kilodalton |
| MIBG | Metaiodobenzylguanidin |
| min | Minute |
| ml | Mililiter |
| mM | Milimolar |
| mRNA | Boten Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid) |
| MTT | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid |
| NB | Neuroblastom |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| RIPA | Radioimmunopräzipitations Puffer (radioimmunoprecipitation assay buffer) |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| rpm | Umdrehung pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| siRNA | Kleine interferierende Ribonukleinsäure (short interfering RNA) |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline) |
| TBST | TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween 20 |
| TEA | Tris-Acetat-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| V | Volt |
| v/v | Volumen/Volumen |
| w/v | Gewicht/Volumen |
| wt | Wildtyp |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Einteilung der Stadien nach dem Internationalen Neuroblastoma Staging System (INSS) | 2 |
| Tabelle 2: Zusammenfassung über die Behandlungsmöglichkeiten beim NB | 4 |
| Tabelle 3: Zusammenfassung der cdk/Cyclin Komplexe und ihre Funktionen..... | 6 |
| Tabelle 4: Übersicht über cdk Inhibitoren in klinischen Studien | 9 |
| Tabelle 5: Geräte..... | 11 |
| Tabelle 6: Verbrauchsmaterial..... | 12 |
| Tabelle 7: Verwendete Chemikalien | 13 |
| Tabelle 8: Verwendete Kits..... | 15 |
| Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren | 15 |
| Tabelle 10: Verwendete Enzyme | 15 |
| Tabelle 11: Verwendete Erstantikörper..... | 16 |
| Tabelle 12: Verwendete Zweitantikörper..... | 16 |
| Tabelle 13: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR..... | 17 |
| Tabelle 14: Verwendete Primer für die Real-Time-PCR..... | 17 |
| Tabelle 15: Verwendete siRNAs..... | 17 |
| Tabelle 16: Medium A-D..... | 18 |
| Tabelle 17: Medium E..... | 19 |
| Tabelle 18: Einfriermedium..... | 19 |
| Tabelle 19: MTT-Lösung | 19 |
| Tabelle 20: Solubilisierungslösung | 19 |
| Tabelle 21: Solubilisierungslösung für nicht adhärenente Zellen | 19 |
| Tabelle 22: RIPA-Puffer..... | 20 |
| Tabelle 23: 4 x Ladepuffer..... | 20 |
| Tabelle 24: DTT-Lösung..... | 20 |
| Tabelle 25: 10 x Laufpuffer für SDS-PAGE..... | 21 |
| Tabelle 26: Sammelgel-Puffer 4 x; pH 6,8 | 21 |
| Tabelle 27: 4 x Trenngel-Puffer | 21 |
| Tabelle 28: Verwendete Puffer für den Semi-dry-Blot..... | 21 |
| Tabelle 29: Ponceau-Lösung..... | 22 |
| Tabelle 30: 10 x TBS; pH 7,5..... | 22 |
| Tabelle 31: TBST | 22 |
| Tabelle 32: 50 x TAE-Puffer | 22 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 33: PBS/A | 23 |
| Tabelle 34: PBT..... | 23 |
| Tabelle 35: Für die Zelllinien verwendete Medien | 25 |
| Tabelle 36: Ansatz für semiquantitative PCR..... | 27 |
| Tabelle 37: Programmeinstellung für die PCR | 27 |
| Tabelle 38: Angaben zur Annealingtemperatur, Zyklenanzahl und Fragmentgrößen | 28 |
| Tabelle 39: Angaben zu den verwendeten GAPDH | |
| Primern bei der semiquantitativen PCR | 28 |
| Tabelle 40: Pipettierschema für siRNA Transfektion [in µl] | 31 |
| Tabelle 41: Pipettierschema für die BSA-Standardreihe | 33 |
| Tabelle 42: Zusammensetzung für 2 SDS-Gele (1,5 mm) | 33 |
| Tabelle 43: Konzentrationsangaben der einzelnen Inhibitoren und der Kombinationen | 37 |
| Tabelle 44: Kombinationsindex und seine Bedeutung (Chou 2006)..... | 38 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Korrelation zwischen dem MYCN Status und dem Überleben von NB Patienten | 3 |
| Abbildung 2: Die Abbildung zeigt die Rolle von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks) im Zellzyklus | 5 |
| Abbildung 3: Behandlungsschema für die Kombinationstherapie aus cdk- und ALK-Inhibitoren. | 37 |
| Abbildung 4: Korrelation zwischen cdk- und Cyclin mRNA-Expression und dem Gesamtüberleben bzw. MYCN Status im Neuroblastom. | 40 |
| Abbildung 5: Expression von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien. | 41 |
| Abbildung 6: Lokalisation von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien. | 43 |
| Abbildung 7: siRNA vermittelte Herunterregulation von cdk1 bzw. CCNB1 auf mRNA- und Proteinebene. | 45 |
| Abbildung 8: Einfluss von RO3306 auf die Zellviabilität. | 46 |
| Abbildung 9: Die Inhibition von cdk1 verringert die Zellviabilität von Neuroblastomzellen unabhängig vom MYCN Status. | 48 |
| Abbildung 10: RO3306 inhibiert die enzymatische Funktion von cdk1. | 49 |
| Abbildung 11: Charakterisierung der p53 knock-down Zellen. | 51 |
| Abbildung 12: Die inhibitorische Wirkung von RO3306 auf die Zellviabilität ist abhängig vom p53 Status. | 53 |
| Abbildung 13: Einfluss von RO3306 auf den Zellzyklus. | 54 |
| Abbildung 14: Einfluss von JNJ-7706621 auf den Zellzyklus. | 55 |
| Abbildung 15: RO3306 induziert eine p53 anhängigen G2-Arrest in Neuroblastomzelllinien. | 56 |
| Abbildung 16: RO3306 verursacht einen p53 abhängigen G2 Arrest in Medulloblastomzellen. | 57 |
| Abbildung 17: Die Inhibition von cdk1 leitet in NB Zellen Apoptose ein. | 58 |
| Abbildung 18: Einfluss der cdk1 Inhibition auf die mitochondriale Aktivität. | 59 |
| Abbildung 19: Caspase-3,-8,-9 mRNA Expression nach RO3306 Behandlung. | 60 |
| Abbildung 20: Caspase-8 und -9 Aktivitätslevel nach cdk1 Inhibition. | 61 |
| Abbildung 21: Die durch RO3306 induzierte Apoptose ist Caspase abhängig. | 62 |
| Abbildung 22: Inhibition der Caspase-Aktivität verhindert die durch RO3306 induzierte Apoptose. | 63 |
| Abbildung 23: RO-3306 aktiviert den p53 Signalweg. | 64 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 24: Effekte der simultanen Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor, RO3306, und den ALK-Inhibitoren, Crizotinib und TAE684, auf die Zellviabilität. | 66 |
| Abbildung 25: Effekte der simultanen Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor, JNJ-7706621, und den ALK-Inhibitoren, Crizotinib und TAE684, auf die Zellviabilität..... | 68 |
| Abbildung 26: Effekte des sukzessiven Behandlungsansatzes unter Einsatz des cdk1-Inhibitors, RO3306, mit anschließender ALK Inhibition auf die Zellviabilität. | 70 |
| Abbildung 27: Effekte des sukzessiven Behandlungsansatzes unter Einsatz des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621, mit anschließender ALK Inhibition auf die Zellviabilität. | 71 |
| Abbildung 28: Effekte der sukzessiven Behandlung mit ALK-Inhibitoren und anschließender Behandlung mit einem cdk1-Inhibitor (RO3306) auf die Zellviabilität. | 73 |
| Abbildung 29: Effekte der sukzessiven Behandlung mit ALK-Inhibitoren und anschließender Behandlung mit einem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) auf die Zellviabilität..... | 74 |

1. Einleitung

1.1 Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB), einer der häufigsten und tödlichsten Tumore des Kindesalters, entsteht aus Vorläuferzellen der Neuralleiste, die entlang des sympathischen Grenzstranges sowie im Nebennierenmark lokalisiert sind. Nach Angaben des deutschen Kinderkrebsregisters lag die kumulative Inzidenz in Deutschland zwischen 2003 und 2012 bei 174 Fällen pro einer Million Kinder unter 15 Jahren (Kaatsch und Spix 2013). Das NB macht 7 % aller Tumore bei Kindern unter 15 Jahren aus und ist in 15 % der Fälle verantwortlich für den Tod im Kindesalter (Hörmann 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag 2000 bei 67 % (Berthold und Hero 2000). Allerdings liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Rückfallpatienten nur noch bei 20 % (London et al. 2011). Das Durchschnittsalter bei Diagnose beträgt 18 Monate, wobei nur 25 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose über 4 Jahre alt sind (Brodeur 2003). Charakteristisch für das NB ist ein sehr heterogenes klinisches Verhalten. Zum einen gibt es Patienten bei denen sich der Tumor als metastasierende Krankheit mit sehr schlechter Prognose darstellt und zum anderen zeigen NB in einigen Säuglingen eine spontane Regression (Brodeur 2003). Am häufigsten sind die Tumore in der Nebenniere und entlang des sympathischen Grenzstranges lokalisiert. Mit einem Anteil von 65 % liegen die Tumore am häufigsten im abdominalen Bereich, wobei 50 % davon wiederum in den Nebennieren zu finden sind. Jedoch sind die Tumore auch im Brustkorb, Becken und Kopf-Halsbereich vorzufinden (Maris 2010).

1.1.1 Stadieneinteilung

Das NB wird durch das „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS) in vier Stadien (Stadium 1, 2A, 2B, 3, 4 und 4S) eingeteilt (Tabelle 1). In den Stadien 1, 2A und 2B sind die Tumore lokalisiert, wohingegen in den Stadien 3, 4 und 4S die Erkrankung fortgeschrittener und der Tumor metastasiert vorliegt. Das Stadium 4S stellt ein besonderes Stadium dar. Dieser Fall tritt nur bei Kindern unter einem Jahr auf und weist metastasierende Tumore auf. Trotz dieser fortgeschrittener Metastasierung kommt es in diesem Stadium besonders oft zu spontanen Regressionen (Brodeur et al. 1993).

Einleitung

Tabelle 1: Einteilung der Stadien nach dem Internationalen Neuroblastoma Staging Sytem (INSS) (Rübben 2009)

| Stadium | Kriterium |
|------------|--|
| Stadium 1 | Lokalisierte Tumore mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischen Resttumor); repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall; mit dem Tumor entfernte anhängende Lymphknoten dürfen befallen sein |
| Stadium 2A | Lokalisierter Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; repräsentative ipsilaterale (nicht am tumoradhärente) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall |
| Stadium 2B | Lokalisierter Tumor mit oder ohne makroskopisch komplette Entfernung; ipsilaterale nicht adhärente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, vergrößerte, kontralaterale Lymphknoten müssen histologisch negativ sein |
| Stadium 3 | Nicht resektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall oder unilateraler lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration (nicht resektabel) oder durch Lymphknotenbefall (das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite) |
| Stadium 4 | Dissemination des Tumors in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe ausgenommen Stadium 4S |
| Stadium 4S | Lokalisierter Primärtumor bei Säuglingen im 1. Lebensjahr (definiert entsprechend dem Stadium 1, 2A oder 2B) mit Dissemination in Haut, Leber und/oder das Knochenmark; der Knochenmarkbefall muss minimal sein, d.h. in der Knochenmarkbiopsie oder Aspiration sind weniger als 10 % aller kernhaltiger Zellen maligne – bei größerem Anteil an Tumorzellen Einordnung als Stadium 4 –, MIBG-Szintigramm im Knochenmark negativ |

1.1.2 Genetische Marker beim Neuroblastom

Zusätzlich zu den oben genannten pathologischen Merkmalen werden immer mehr molekulargenetische Marker zur Stadieneinteilung und vor allem für die Therapiewahl herangezogen. Eine bereits vor 30 Jahren erkannte genetische Veränderung im Neuroblastom ist die MYCN (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) Amplifikation, die von Schwab und Kollegen entdeckt wurde. Es handelt sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle beim Wachstum und bei der

Proliferation des Tumors spielt (Brodeur et al. 1984). Einen Zusammenhang zwischen der MYCN Amplifikation, die in ca. 20-25 % der Neuroblastome vorkommt, und einer schlechten Prognose der Krankheit beschreiben Brodeur und Seeger sowie Maris und Kollegen. (Seeger et al. 1985; Maris und Matthay 1999). Ein weiterer Faktor, der Aufschluss über die

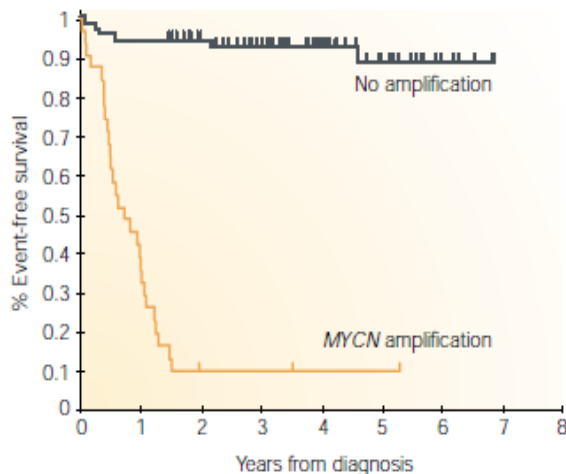


Abbildung 1: Korrelation zwischen dem MYCN Status und dem Überleben von NB Patienten. Die Kaplan-Meier Kurve zeigt, dass Patienten mit einer MYCN Amplifikation deutlich schlechtere Überlebenschancen haben als Patienten ohne Amplifikation (Brodeur 2003).

Prognose gibt, ist die Expression von Neurotrophinrezeptoren. So deutet die Expression des Neurotrophinrezeptors TrkA auf einen guten Verlauf der Krankheit hin, wohingegen die Expression des Neurotrophinrezeptors TrkB mit einer schlechten Prognose korreliert (Brodeur 2003). Häufig in familiären und auch in 10 % der sporadisch auftretenden Neuroblastoma wird eine aktivierende Mutation der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) diagnostiziert. Bei der am häufigsten vorkommenden ALK Mutation ist das an der Stelle 1174 liegende Phenylalanin durch ein Leucin ausgetauscht. Diese Mutation (F1174L) korreliert mit einem aggressiven Krankheitsverlauf (Chen et al. 2008; de Brouwer et al. 2010; Mossé et al. 2008).

1.1.3 Therapiemöglichkeiten beim Neuroblastom

Die Therapie eines Neuroblastoms orientiert sich an der Stadieneinteilung. Sie kann aus Operationen, Bestrahlung, Chemotherapien oder der Kombination aus mehreren Ansätzen bestehen. Die Therapie kann durch Stammzelltransplantation sowie durch die Behandlung mit Retinsäuren und bei metastasierenden Tumoren auch durch die Metaiodobenzylguanidin (MIBG)-Therapie ergänzt werden (Tabelle 2). MIBG, welches strukturell dem Noradrenalin ähnelt und durch neuroendokrine Zellen aufgenommen wird, wird mit radioaktivem Iod markiert. So wird eine interne Strahlentherapie ermöglicht, die spezifisch auf den Tumor wirkt (Hoefnagel 1994). Es wird jedoch weiterhin versucht, Therapieansätze zu entwickeln, die weniger toxisch sind und geringere Nebenwirkungen mit sich bringen. Vor allem wird nach therapeutischen Ansätzen geforscht, bei denen spezifische Targets inhibiert werden. Einige dieser Inhibitoren haben es bereits in klinische Studien geschafft. Dazu gehören auch die Inhibitoren von Tyrosin Kinasen, wie die Anaplastische Lymphoma Kinase (ALK) oder die

Einleitung

Tropomyosin Rezeptor Kinase (TRK) (Verissimo et al. 2011). In den letzten Jahren wurden auch immer wieder neue Inhibitoren gegen Komponenten, die eine Rolle im Zellzyklus spielen, vor allem Cyclin-abhängige Kinasen, getestet (Lapenna und Giordano 2009).

Tabelle 2: Zusammenfassung über die Behandlungsmöglichkeiten beim NB
(Bhatnagar und Sarin 2012)

| Stadium | Behandlungsmöglichkeiten |
|----------|--|
| 1 | Operation |
| 2 | Operation Chemotherapie |
| 3 und 4 | Chemotherapie Operation Radiotherapie Myeloablative Chemotherapie + autologe Knochenmarktransplantation/ Stammzelltransplantation Immuntherapie Retinoid Therapie Zielgerichtete Abgabe von Radionukliden |
| 4s | Beobachtung Chemotherapie Radiotherapie Operation |
| Rezidive | Chemotherapie Zielgerichtete Abgabe von Radionukliden Immuntherapie Retinoide Angiogenese Inhibitoren Tyrosin Kinase Inhibitoren Aurora Kinase Inhibitoren |

1.2 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Bei Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks), von denen bereits mindestens 20 identifiziert werden konnten, handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen. Zusammen mit den Cyclinen (CCNs), mit denen sie Komplexe bilden, spielen sie eine wichtige Rolle im Zellzyklus (Abbildung 2). Die aktiven Komplexe sind in der Lage Proteine, die eine Rolle bei der Transkription und beim Zellzyklus spielen, zu phosphorylieren (Vermeulen et al. 2003). Im Zellzyklus von Säugerzellen sind sechs cdks beteiligt (cdk1, cdk2, cdk3, cdk4, cdk6, cdk7) (Morgan 1997; Vermeulen et al. 2003). Jede Zellzyklusphase wird durch einen bestimmten cdk/Cyclin Komplexe reguliert: Die Komplexe cdk4/Cyclin D, cdk6/Cyclin D sowie der Komplex cdk2/Cyclin E spielen eine Rolle in der G₁-Phase. Der Komplex cdk2/Cyclin A ist bei dem Übergang von der S- zur G₂-Phase beteiligt. In der G₂-Phase übernimmt der cdk1/Cyclin A und in der S-Phase der cdk1/Cyclin B eine entscheidenden Rolle. Cdk7 interagiert mit Cyclin H und ist an der Aktivierung weiterer cdk/Cyclin Komplexe beteiligt (Vermeulen et al. 2003). Zusätzlich beschreiben Ren und Rollins, dass cdk3/Cyclin C eine Rolle beim Wiedereintritt aus dem Ruhezustand, G₀, in den Zellzyklus spielt (Ren und Rollins 2004) (Tabelle 3).

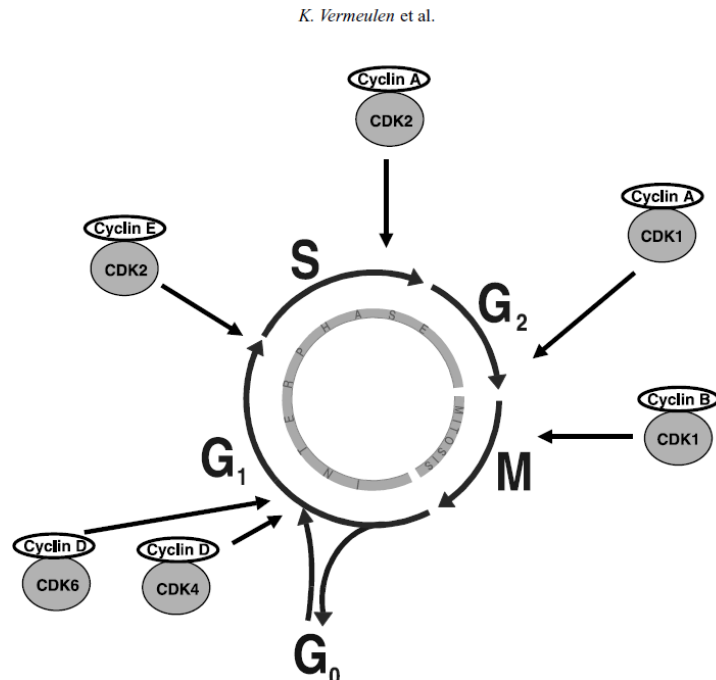


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt die Rolle von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks) im Zellzyklus (modifiziert nach Vermeulen et al. 2003).

Einleitung

Neben der Aktivierung der cdk's durch die Bindung an die entsprechenden Cycline, wird die Aktivität durch die Phosphorylierung an bestimmten Threonin- und Tyrosinresten gesteuert. Beispielsweise benötigt eine vollständige Aktivierung von cdk1 die Phosphorylierung des Threonin 161. Diese Aufgabe wird durch den cdk7/Cyclin H Komplex übernommen (Lolli und Johnson 2005). Es gibt auch negative Regulationsmechanismen, hierbei wird die cdk-Aktivität durch cdk Inhibitoren (CDKI; cyclin dependent kinase inhibitors) verhindert. Es gibt zwei verschiedene Familien der cdk Inhibitoren, die INK4 Familie und die CIP/KIP Familie. Mitglieder der INK4 Familie, bestehend aus p15, p16, p18 und p19, binden spezifisch an cdk4 und cdk6 und verhindern so eine Interaktion mit Cyclin D (Sherr und Roberts 1995). Die zweite Familie, die CIP/KIP Familie (p21, p27 und p57), binden an cdk/Cyclin Komplexe und verhindern die Substratbindung (Sherr und Roberts 1995). P21 verhindert zudem die DNA-Synthese durch die Bindung und somit Inhibierung von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Cayrol et al. 1998). CDKIs werden durch externe und interne Signale reguliert. Zum Beispiel steht p21 unter der transkriptionellen Kontrolle des Tumorsuppressors p53 (El-Deiry et al. 1993). Im Gegensatz dazu wird die Expression und Aktivierung von p15 sowie p27 durch den Wachstumsfaktor TGF- β reguliert (Vermeulen et al. 2003).

Tabelle 3: Zusammenfassung der cdk/Cyclin Komplexe und ihre Funktionen (modifiziert nach Vermeulen et al. 2003; Ren und Rollins 2004)

| Cdk | Cycline | Zellzyklusphase |
|------|-------------------|-----------------------------|
| Cdk4 | Cyclin D1, D2, D3 | G1-Phase |
| Cdk6 | Cyclin D1, D2, D3 | G1-Phase |
| Cdk2 | Cyclin E | G1/S-Phasen Übergang |
| Cdk2 | Cyclin A | S-Phase |
| Cdk1 | Cyclin A | G2/M-Phase |
| Cdk1 | Cyclin B | Mitose |
| Cdk7 | Cyclin H | Alle Zellzyklusphasen |
| Cdk3 | Cyclin C | Wiedereintritt aus G0-Phase |

1.2.1 Rolle von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen bei Krebserkrankungen

Dysregulation des Zellzyklus ist charakteristisch für Krebszellen. Bei Tumoren konnten Mutationen in einer Reihe von Genen, die am Zellzyklus beteiligt sind, nachgewiesen werden (Sherr und Roberts 1995; McDonald und El-Deiry 2000). Ebenso konnte in einer Vielzahl von Tumoridentitäten, wie beispielsweise in Lymphomen, Melanomen und Brust- und Lungenkarzinomen, eine Hochregulation von Cyclinen und cdk's gezeigt werden (Vermeulen et al. 2003). Eine Überexpression von Cyclin B1 konnte beispielsweise in Brusttumoren festgestellt werden (Chae et al. 2011; Li et al. 2003). In kolorektalen Tumoren liegt ebenfalls eine Überexpression von CCNB1 sowie von cdk1 und cdk2 vor (Yamamoto et al. 1998). Im Neuroblastom ist bekannt, dass cdk2 überexprimiert wird und mit einem schlechten Verlauf der Krankheit einhergeht (Molenaar et al. 2009). Cdk1 wird unter anderem auch in Prostatakarzinomen und in Plattenepithelkarzinomen überexprimiert (Liu et al. 2008; Chang et al. 2005). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von cdk1 und der Überlebensrate bei Brustkrebs Patienten gezeigt werden (Li et al. 2003).

1.2.2 Inhibition von cdk's als therapeutische Option

Auf Grund der Tatsache, dass cdk's in einer Vielzahl von Tumoren überaktiviert sind und somit einen Beitrag zu der unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen liefern, wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv an cdk-Inhibitoren geforscht. Die Forschung beschäftigte sich vor allem mit der Inhibierung von cdk2, cdk4, und cdk5 wobei in letzter Zeit auch cdk1 mehr in den Fokus gelangt. Allerdings hat es bisher kein Wirkstoff in die klinische Verwendung geschafft. Die Inhibitoren der ersten Generation wie die pan cdk-Inhibitoren Flavopiridol, Olomoucine und Roscovitine konnten die Erwartung in den klinischen Studien nicht erfüllen. Es zeigte sich, dass die Inhibitoren toxisch und/oder nur in geringen Maßen wirkten (Lapenna und Giordano 2009). Momentan befindet sich eine Reihe von Inhibitoren in klinischen Untersuchungen. Eine Übersicht ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Allerdings werden noch immer neue cdk-Inhibitoren synthetisiert und untersucht. Zwei neuere Inhibitoren, die sich in vorklinischen Untersuchungen befinden, sind der Breitspektrum Inhibitor JNJ-7706621, der die Aktivität von cdk1 und cdk2 sowie von den Kinasen Aurora A und B beeinflusst und der spezifische cdk1-Inhibitor RO3306 (Lapenna und Giordano 2009). JNJ-7706621 führt zu einer Verringerung der Zellproliferation und induziert Apoptose in humanen Tumorzellen, beispielweise aus Zervikaltumoren, Kolontumoren, Prostatatumoren oder Melanomen (Emanuel 2005). Vassilev et al. konnten 2006 das Quinolinyl Thiazolinone Derivat, RO3306, als spezifischen cdk1-Inhibitor identifizieren. RO3306 inhibiert cdk1/CCNB1 Aktivität mit einem Ki-Wert (Dissoziationskonstante) von 35 nM. Im Gegensatz

dazu ist der Ki-Wert für cdk2/CCNBE fast 10-mal so hoch und für cdk4/CCND sogar 50-mal höher. RO3306 ist wie JNJ-7706621 ein ATP kompetitiver Inhibitor und bindet in die ATP-Bindungstaschen von cdk1. Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor in humanen Tumorzellen zu einer Blockierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase sowie zu einem Anstieg der Apoptose führt (Vassilev et al. 2006; Kojima et al. 2009). Bisher liegen keine Ergebnisse für die Behandlung von Neuroblastomzellen mit diesen Inhibitoren vor. Daher sollte in dieser Arbeit die Wirkung von RO3306 und JNJ-7706621 in Neuroblastomzelllinien untersucht werden.

1.2.2.1 Cdk-Inhibition im Neuroblastom

Auch im Neuroblastom sind einige Aberrationen von Zellzyklusregulatoren beschrieben. Dazu zählen Amplifikationen von Cyclin D1 und cdk4 sowie Mutationen von cdk6 (Easton et al. 1998; Molenaar 2003). Molenaar et al. konnten in Neuroblastomen eine starke Korrelation zwischen der cdk2 Expression und der Prognose zeigen. Dies deutet darauf hin, dass cdk2 auch im Neuroblastom vielversprechende therapeutische Targets sind (Molenaar et al 2009; Delehouzé et al. 2013; Garrofé-Ochoa et al. 2011; Löschmann et al. 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inaktivierung von cdk2 in Neuroblastomzellen mit hohen MYCN Leveln „synthetisch letal“ ist. Als synthetische Letalität versteht man die letale Abhängigkeit zwischen eines inhibierten oder runterregulierten Genes von einem aktivierten oder mutierten Onkogenes (Molenaar et al. 2009). Des Weiteren konnten Löschmann et al. einen antiproliferativen Effekt des cdk2, cdk7 und cdk9 Inhibitors SNS032 in neun Neuroblastomzelllinien nachweisen.

Einleitung

Tabelle 4: Übersicht über cdk Inhibitoren in klinischen Studien (modifiziert nach Lapenna und Giordano 2009)

| Inhibitor | Haupttargets (Nebentargets) | Klinische Studien |
|---|---|---|
| AG-024322 (Pfizer) [‡] | CDK1, CDK2 und CDK4 (und andere CDKs) | Phase I: fortgeschrittener Krebs; Studien wurden abgebrochen (2007), da der Wirkstoff keinen angemessenen Unterschied zu anderen Behandlungsmöglichkeiten zeigen konnte |
| AT7519 (Astex) [‡] | CDK2, CDK4, CDK5 und CDK9 (CDK1, CDK4, CDK6 und GSK3β) | Phase I: fortgeschrittene oder metastasierende Tumore, solide Tumore, oder refraktäre NHL |
| AZD5438 (AstraZeneca) [*] | Nicht bekannt | -Phase I: fortgeschrittene solide Tumore -Studien abgebrochen (2009) aufgrund der geringen klinischen Verträglichkeit und Belastungsdaten |
| Flavopiridol, auch bekannt als alvocidib (Sanofi–Aventis) [‡] | CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 und CDK9 (GSK3 β) | Phase I–II: verschiedene Krebstypen, u.a. Leukämie, multiple Myelome, Lymphome, Sarkome und solide Tumore (als Einzelwirkstoff und in Kombination mit DNA-schädigenden oder cytotoxischen Medikamenten) |
| Indisulam, auch bekannt als E7070 (Eisai) ^{‡§} | Nicht bekannt | Phase I–II: adulte solide Tumore, Stufe IV Melanome (als Einzelwirkstoff) Phase I: gastrointestinaler Pankreas- und Lungenkrebs (in Kombination mit Irinotecan) |
| P1446A-05 (Nicholas Piramal) [*] | CDK4 (Nicht bekannt) | Phase I: fortgeschrittene refraktäre Malignitäten wie solide und hämatologische Tumore |
| P276-00 (Nicholas Piramal) [‡] | CDK1, CDK4 und CDK9 (CDK2, CDK6 und CDK7) | Phase I–II: multiple Myelome, Mantelzelllymphome, Kopf- und Halstumore, sowie Cyclin D1-positive Melanome |
| PD-0332991 (Pfizer) [*] | CDK4 und CDK6 (Nicht bekannt) | Phase I: fortgeschrittener Krebs, Mantelzelllymphome Phase I–II: multiple Myelome (in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason), Hormonrezeptor-positive fortgeschrittene Brusttumore (in Kombination mit Letrozole) |
| R-roscovitine, auch bekannt als CYC202 und seliciclib (Cyclacel) [*] | CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 und CDK9 (CK1, GSK3α–β, DYRK1A, ERK1, ERK2 und PDXK) | Phase I–II: NSCLC Studien abgeschlossen (2009), bei einer Verabreichung von 800 mg zweimal täglich für sieben Tage, wird eine limitierte Tumorantwort und eine dosislimitierende Toxizität hervorgerufen (Müdigkeit, Hautausschlag und Hypokaliämie) |
| R547, auch bekannt als Ro-4584820 (Hoffmann–La Roche) [‡] | CDK1, CDK2, CDK4 und CDK7 (Nicht bekannt) | Phase I: fortgeschrittene solide Tumore; Studie abgeschlossen (2008) |
| SCH 727965 (Schering–Plough) [‡] | CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9 (Nicht bekannt) | Phase I: fortgeschrittene solide Tumore, NHL, multiple Myelome und CLL. Phase II: fortgeschrittener Brustkrebs, NSCLC, akute Leukämie und Lymphome; erste klinische Ergebnisse deuten auf eine gute Verträglichkeit bei 58 mg/m ² ; dosislimitierende Toxizität führte zu Neutropenie |
| SNS-032, auch bekannt als BMS-387032 (Sunesis) [‡] | CDK2, CDK7 und CDK9 (CDK1 und CDK4) | Phase I: B-Lymphomen und fortgeschrittene solide Tumore |
| Terameprocol, auch bekannt als EM-1421 (Erimos) [‡] | CDK1, Survivin und VEGFRs (Nicht bekannt) | Phase I: Leukämie, refraktäre solide Tumore und Lymphome |
| ZK 304709, auch bekannt als MTGI und ZK-CDK (Schering AG) [*] | CDK1, CDK2, CDK4, CDK7 und CDK9 (VEGFR1 VEGFR2, VEGFR3 und PDGFRβ) | Phase I: fortgeschrittene solide Tumore |

[‡]Intravenös, ^{*}Oral, [§]Indisulam ist kein direkter cdk-Inhibitor, er verursacht eine Verringerung der Cyclin E- und Cyclin H-Level, wodurch die Aktivität von cdk2 und cdk7 verringert wird.

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks) bzw. Cyclinen und dem Verlauf der Krankheit bzw. dem MYCN Status im Neuroblastom?** Dazu sollten bereits vorhandene Exon Array Daten primärer Neuroblastome reanalysiert und auf Korrelationen zwischen der Expression von Zellzyklusregulatoren und dem Gesamtüberleben bzw. MYCN Amplifikation überprüft werden. Außerdem sollte die Expression sowie die Lokalisierung von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien untersucht werden.
- 2. Eignet sich der cdk1/CCNB1 Komplex als therapeutisches Target?**
Um zu untersuchen, ob sich cdk1 bzw. CCNB1 als potentiell Target für die Behandlung von Neuroblastomen eignet, sollten siRNA vermittelte Knock-downs durchgeführt werden. Des Weiteren sollte die pharmakologische Inhibition von cdk1 zum einen durch einen cdk1 spezifischen Inhibitor (RO3306) und einem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) getestet werden.
- 3. Welche Signalwege werden durch die Inhibition von cdk1 in der Zelle induziert?**
Durch Untersuchung auf RNA- und Proteinebene sollten die ausgelösten Signalwege näher betrachtet werden. Außerdem wurden mögliche Apoptosewege durch den Nachweis von Caspase-Aktivitäten untersucht.

3. Material

Alle für diese Arbeit verwendeten Materialien sind tabellarisch mit Angaben zum Hersteller in diesem Kapitel vermerkt. Informationen zur Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Gebrauchslösungen befinden sich unter Punkt 3.11 ebenfalls in diesem Kapitel.

3.1 Geräte

Tabelle 5: Geräte

| Geräte | Bezugsquelle |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophoresekammer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Biodoc Analyzer Geldokumentation | Biometra, Göttingen |
| BioPhotometer | Eppendorf, Hamburg |
| Brutschrank Steri Cult 200 Incubator | Forma Scientific Inc., Schwerte |
| Durchflusszytometer FC500 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Eismaschine | Scotsman, Italien |
| Elektrophoresekammer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| HandyStep | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim |
| Heizblock Thermostat TCR 100 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Konfokalmikroskop A1 Nikon Eclipse Ti | Nikon, Düsseldorf |
| Lumineszenz Entwicklungsgerät Photochem | Analytik Jena AG, Jena |
| Mikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikrowelle | SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Brühl |
| Modulus Microplate Reader | Turner Biosystems/ Promega, Mannheim |
| NanoDrop1000 Spektrophotometer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| PCR-Cycler (C1000 Thermal cycler) | BioRad, München |
| Pipettierhilfe Rota Filler 3000 | Heathrow Scientific, USA |
| Rollschüttler RS-TR05 | Phoenix Instruments, Garbsen |
| Semi-Dry Blotter | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Spannungsgerät Biometra Standard Power Pad 25 | Biometra, Göttingen |
| Spannungsgerät Major Science MP 3AP | Kisker Biotech GmbH, Steinfurt |
| StepOne Plus Real-Time-PCR Applied | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Sterilbank Hera Safe | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Universal Microplate Reader EL 800 | Bio-TEK Instruments, Bad Friedrichshall |
| Vortexer | Heidolph, Schwabach |

Material

| Geräte | Bezugsquelle |
|-----------------------------|--|
| Waage | KERN & SOHN GmbH, Balingen |
| Wasserbad | GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Z1 Coulter Partikel Counter | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge 5424R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Allegra X-22R | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge Rotixa 50 RS | Hettich GmbH, Tuttlingen |

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial

| Materialien | Bezugsquelle |
|---|--------------------------------------|
| 15-Loch Kamm (Western Blot) | Biostep GmbH, Jahnsdorf |
| 20-Loch Kamm (PCR) | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| 24- und 96-Loch-Platten | Starlab, Hamburg |
| 6- und 12-Loch-Platten | Corning, Kaiserslautern |
| 96-Multi-Loch-Platte, weiß | Thermo Scientific, USA |
| Combitips (0,5 ml; 2,5 ml; 5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Cryoröhrchen | Simport, Kanada |
| Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Glasplatten (ohne/mit Spacer 1,5 mm) | Biostep GmbH, Jahnsdorf |
| Kanülen (0,4 mm Durchmesser) | B.Braun, Melsungen |
| Kulturflaschen (25 cm ²) | Corning, Kaiserslautern |
| Kulturflaschen (75 cm ²) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Parafilm | Pechinery, USA |
| Pasteurpipetten | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim |
| PCR-Reaktionsgefäße | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| PCR-Stripes | Axygen, USA |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Starlab, Ahrensburg |
| PMMA- Einmalküvetten | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Protran Nitrozellulose | GE Healthcare, Freiburg |

Material

| Materialien | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Zellschaber (28 cm) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Zellulose Blot Papier (3 mm dick) | GE Healthcare, Freiburg |
| Zentrifugenröhrchen | Beckman Coulter, Krefeld |

3.3 Chemikalien, Puffer, Medien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|------------------------------------|---|
| (Z)-4-Hydroxytamoxifen | Sigma, Steinheim |
| 100 bp Marker | Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| 2-Propanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Acrylamid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Agarose | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Albumin Fraktion V | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma, Steinheim |
| Amphotericin B | PAA Laboratories, Pasching |
| Blasticidin | Invitrogen, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Calciumchlorid | Sigma, Steinheim |
| Chloroform | J.T. Baker Chemicals, Niederlande |
| Dest. Wasser | B.Braun, Melsungen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma, Steinheim |
| DMEM+GluMax | Life technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| ECL-Prime | GE Healthcare, Freiburg |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ethanol | VWR International, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ethylendiaminetetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Fast SYBR® Green Master Mix | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| FCS "Gold" | PAA Laboratories, Pasching |
| Geneticin G418 | Cellgro (Corning), USA |
| Glycerin | Sigma, Steinheim |

Material

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|----------------------------------|---|
| Glycin | Sigma, Steinheim |
| Immunmount | Fisher Scientific, Schwerte |
| Isopropanol | Sigma, Steinheim |
| Isoton-Lösung | Beckman Coulter, Krefeld |
| Lithium Dodecylsulfat | Sigma, Steinheim |
| Luminol | Sigma, Steinheim |
| Magermilchpulver | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Methanol | VWR International, Darmstadt |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumdesoxycholat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| NP-40 | Sigma, Steinheim |
| Paraformaldehyd 4 %ig (PFA) | Morphisto, Frankfurt am Main |
| PBS (1x und 10x) | Invitrogen, Darmstadt |
| Pen-Strep | Life technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| Phenolrot | Sigma, Steinheim |
| Ponceau S | Serva, Heidelberg |
| Precision Plus Protein Standard | BioRad, München |
| Propidiumiodid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Rotiphoese Gel 30 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| RotiQuant | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| RPMI 1640 | Life technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Serva Blue R Tabletten | Serva, Heidelberg |
| TaqMan® Fast Advanced Master Mix | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Terralin | Schülke, Norderstedt |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | National diagnostics, Giessen |
| Thiazolylblau | Sigma, Steinheim |
| TRIS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TRIS Base | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Tris Hydrochlorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Triton-X | Merck, Darmstadt |
| Trypsin/EDTA | Life technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| Tween-20 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

3.4 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

| Name | Bezugsquelle |
|---|-------------------|
| Caspase 8 Glo® Assay | Promega, Mannheim |
| Caspase 9 Glo® Assay | Promega, Mannheim |
| Cell Death ELISA Plus | Roche, Mannheim |
| RNA Isolation Kit | Roche, Mannheim |
| RNeasy Micro Kit | Qiagen, Hilden |
| Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche, Mannheim |

3.5 Inhibitoren

Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren

| Name | Zielstruktur | Bezugsquelle |
|--|--------------------------------|--|
| JNJ-7706621 | Cdk1, cdk2, Aurora A, Aurora B | Selleckchem/Biozol Diagnostica Vertrieb gmbH; Eching |
| RO3306 | Cdk1 | Calbiochem, Darmstadt |
| InSolution™ Q-VD-Oph Non-O-methylated | Caspase-1, -3, -8, -9 | Calbiochem, Darmstadt |
| Crizotinib | ALK | Axon medchem, Niederlande |
| NVP-TAE 684 | ALK | Axon medchem, Niederlande |

3.6 Enzyme

Tabelle 10: Verwendete Enzyme

| Name | Bezugsquelle |
|---|---------------------------|
| Complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail | Roche, Mannheim |
| MyTaq™ HS Red Mix | Bioline, Luckenwalde |
| PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren | Roche, Mannheim |
| RNase A | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| RNase H | TaKaRa, Japan |

3.7 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Erstantikörper

| Bestellnr. | Spezifität | Verdünnung | Spezies | Bezugsquelle |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|--|
| A5441 | Beta-Aktin | 1:5000 | Maus | Sigma, Steinheim |
| H00000891-M01 | CCNB1 | 1:500 (für WB) | Maus | Abnova, Heidelberg |
| AHF0052 | CCNB1 | 1:100 (für Immunocytochemie) | Maus | Invitrogen, Darmstadt |
| MAB8878 | Cdk1 | 1:500 | Maus | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach |
| 2947 | p21 | 1:500 | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Niederlande |
| Sc-71817 | p53 | 1:500 | Maus | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| 2581 | Phospho-PP1 α (Thr320) | 1:500 | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Niederlande |
| 9308 | Phospho-Rb (Ser807/811) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Niederlande |
| 2582 | PP1 α | 1:500 | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Niederlande |

Tabelle 12: Verwendete Zweitantikörper

| Bestellnr. | Spezifität | Verdünnung | Spezies | Bezugsquelle |
|------------|------------------------------|------------|---------|-------------------------|
| NA9310V | Anti Maus HRP-gekoppelt | 1:1000 | Schaf | GE Healthcare, Freiburg |
| 1030-02 | Anti Maus FITC-gekoppelt | 1:1000 | Ziege | Southern Biotech, USA |
| NA9340V | Anti Kaninchen HRP-gekoppelt | 1:1000 | Affe | GE Healthcare, Freiburg |

3.8 Primer

Tabelle 13: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR

| Primer | Sequenz | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| | forward | reverse |
| BAX | accaaagaagctgagcgagtgc | tgtccagcccatgatggtc |
| Caspase8 | tccaaatgcaaactggatga | caaggctgctgcttctct |
| Caspase3 | ctcggcgctctggtttcgg | ccctgaggttgctgcatcgaca |
| Caspase9 | gagccgcgagctgttcaggc | gaggagaagcgacgccgcaa |
| CCNB1 | tctgctgggtgtaggtcctt | cctgccatgttgatcttcg |
| cdk1 | agccgggatctaccataccc | atggctaccactgacctgt |
| GAPDH | ccacccatggcaaattccatggca | tctagacggcaggtcaggtccacc |
| GAPDH kl. Fragment | catcaagaaggtggtgaagc | gagcttgacaaagtggctgt |
| MDM2 | ggcctgctttacatgtgcaa | gcacaatcattgaattggtgtc |
| p21 | cctcatcccggtgtctccttt | gtaccacccagcggacaagt |
| p53 | gtgacacgctccctggatt | gcaccaccacactatgtcgaa |

Alle Primer wurden bezogen durch die MWG Biotech AG.

Tabelle 14: Verwendete Primer für die Real-Time-PCR

| Genname | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|---------|---------------|-------------------------------|
| CCNB1 | Hs00259126_m1 | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Cdk1 | QT00042672 | Qiagen, Hilden |

3.9 siRNAs

Tabelle 15: Verwendete siRNAs

| Name | Zielsequenz | Bezugsquelle |
|----------------|----------------------------|------------------------|
| siRNA_CCNB1_a | 5'AATGTAGTCATGGTAAATCAA3' | Qiagen, Hilden |
| siRNA_CCNB1_b | 5'CCGAGTCACCAGGAAGCTCGAA3' | Qiagen, Hilden |
| siRNA_cdk1 | 5'AAGGGGTTCTAGTACTGCAA3' | Qiagen, Hilden |
| Neg. Kontrolle | 5'UAGCGACUAAACACAUCAA3' | Thermo Scientific, USA |

3.10 Zelllinien

Bei den für diese Arbeit verwendeten Neuroblastomzelllinien (IMR32, NB69, NGP, NLF, SH-EP, SK-N-FI, WAC2) und der Rhabdomyosarkomzelllinie (RH-41) handelt es sich um bereits langjährig etablierte und beschriebene Zelllinien. Zusätzlich wurden Zellen, mit induzierbarer MYCN-Aktivität, SH-EP MYCN-ER, verwendet (Schulte et al. 2008). Diese Zellen sowie die mit einer p53 dominant negativen Form transfizierten Medulloblastomzellen HDMB3 (HDMB3 p53 dn) (Henssen et al. 2013) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. J.H. Schulte (Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Außerdem wurde in dieser Arbeit mit lentiviral transfizierten IMR32 und NGP Zellen gearbeitet, die shRNA gegen murines p53 und humanes p53 exprimieren (van Maerken et al. 2006). Die Zellen wurden uns dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Speleman (Zentrum für medizinische Genetik, Ghent, Belgien) zur Verfügung gestellt.

3.11 Verwendete Puffer und Lösungen

3.11.1 Zellkultur

Tabelle 16: Medium A-D

| Inhaltsstoffe | Konzentration | | | |
|--|---------------|----------|----------|----------|
| | Medium A | Medium B | Medium C | Medium D |
| FCS | 10 % | 15 % | 10 % | 10 % |
| Pen-Strep (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin) | 1 % | 1 % | 1 % | 1 % |
| Amphotericin B (250 µg/ml) | 1 % | 1 % | 1 % | 1 % |
| Geneticin (50 mg/ml) | - | - | 1 % | - |
| Puromycin (1 mg/ml) | - | - | - | 0,1 % |

Ad 500 µl RPMI-Medium

Tabelle 17: Medium E

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|--|---------------|
| DMEM-Medium | |
| FCS | 10 % (v/v) |
| Pen-Strep (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin) | 1 % (v/v) |
| Amphotericin B (250 µg/ml) | 1 % (v/v) |

Tabelle 18: Einfriermedium

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| DMSO | 10 % (w/v) |

ad 50 ml FCS

3.11.2 Proliferations Assay

Tabelle 19: MTT-Lösung

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| Thiazolylblau | 0,5 % (w/v) |

ad 20 ml dest. Wasser; Lösung steril filtrieren

Tabelle 20: Solubilisierungslösung

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| SDS | 10 % (w/v) |
| Essigsäure | 0,6 % (v/v) |

ad 20 ml DMSO

Tabelle 21: Solubilisierungslösung für nicht adhärenente Zellen

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| SDS | 10 % (w/v) |
| Essigsäure | 5 % (v/v) |

ad 20 ml DMSO

3.11.3 Zelllyse

Tabelle 22: RIPA-Puffer

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|--|---------------|
| TRIS | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| 100 mM EDTA, pH 7,4 | 1 mM |
| NP40 | 1 % (v/v) |
| 10 % Natriumdesoxycholat | 1 % (v/v) |
| 10 % SDS Lösung | 0,1 % (v/v) |
| Proteinase Inhibitoren (Roche) | 1 Tablette |
| PhosStop Phosphatase Inhibitoren (Roche) | 2 Tabletten |

ad 50 ml dest. Wasser

3.11.4 SDS PAGE

Tabelle 23: 4 x Ladepuffer

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| TRIS-HCl | 424 mM |
| TRIS-Base | 564 mM |
| Lithium Dodecylsulfat | 8 % (w/v) |
| EDTA | 2,04 mM |
| Glycerin | 40 % |
| 1 % Coomassie Blau | 7,5 % (v/v) |
| 1 % Phenolrot | 2,5 % (v/v) |

ad 10 ml dest. Wasser

Tabelle 24: DTT-Lösung

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| DTT | 0,5 M |
| Na-Acetat; pH 5,2 | 10 mM |

ad 10 ml dest. Wasser

Tabelle 25: 10 x Laufpuffer für SDS-PAGE

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|------------------|---------------|
| TRIS-HCl; pH 6,8 | 125 mM |
| Glycin | 960 mM |
| SDS | 0,5 % (w/v) |

ad 1000 ml dest. Wasser

Tabelle 26: Sammelgel-Puffer 4 x; pH 6,8

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| TRIS-Base | 0,5 M |
| SDS | 0,4 % (w/v) |

ad 250 ml dest. Wasser

Tabelle 27: 4 x Trenngel-Puffer

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| TRIS-Base | 1,5 M |
| SDS | 0,4 % (w/v) |

ad 500 ml dest. Wasser

3.11.4 Western Blot

Tabelle 28: Verwendete Puffer für den Semi-dry-Blot

| Inhaltsstoffe | Konzentration | | |
|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | Anode1-Puffer | Anode2-Puffer | Kathode-Puffer |
| TRIS | 0,3 M | 25 mM | 25 mM |
| Methanol | 20 % (v/v) | 20 % (v/v) | 10 % (v/v) |
| Glycin | - | - | 40 mM |
| 10 % SDS | - | - | 0,005 % (v/v) |

ad 0,5 l dest. Wasser

Tabelle 29: Ponceau-Lösung

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| Ponceau S | 0,1 % (w/v) |
| Essigsäure | 5 % (v/v) |

ad 200 ml dest. Wasser

Tabelle 30: 10 x TBS; pH 7,5

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| NaCl | 2 M |
| TRIS-Base | 1,45 M |

ad 500 ml dest. Wasser

Tabelle 31: TBS-T

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| 10 x TBS | 10 % (v/v) |
| Tween20 | 0,2 % (v/v) |

ad 2 l dest. Wasser

3.11.5 PCR

Tabelle 32: 50 x TAE-Puffer

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| TRIS-Base | 2 M |
| Eisessig | 5,71 % (v/v) |
| EDTA 0,5 M | 50 mM |

ad 1 l dest. Wasser

3.11.6 Immunozytochemie

Tabelle 33: PBS/A

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| BSA | 1 % |

ad 50 ml PBS

Tabelle 34: PBT

| Inhaltsstoffe | Konzentration |
|---------------|---------------|
| BSA | 1 % |
| Triton X 100 | 0,1 % |

ad 50 ml PBS

4. Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sollen in den nächsten Kapiteln näher erläutert werden.

4.1 Exon Array Studien primärer Neuroblastome

Die in dieser Arbeit verwendeten Exon Array Daten basieren auf den Ergebnissen von Affymetrix HuEx1.0 Exon Arrays (GEO acc. No GSE32664), wobei 101 Neuroblastome aus Essen (Deutschland) und Ghent (Belgien) mit einbezogen wurden (Eschenburg et al. 2012). Davon waren 76 der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 1 Jahr, die übrigen 25 Patienten waren 1 Jahr oder jünger. Die Stadieneinteilung gestaltete sich wie folgt: Stadium1: n=23; Stadium2: n=7; Stadium3: n=11; Stadium4: n=42; Stadium4S: n=18. MYCN Amplifikationen konnten in 19 Tumoren nachgewiesen werden. Zur Analyse der Daten wurde das Exon Array Analyse Programm R2 (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) verwendet.

4.2 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden zuvor autoklaviert oder es wurden sterile Einwegartikel verwendet. Die Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.2.1 Auftauen und Einfrieren von humanen Neuroblastomzellen

Um die Zellen aufzutauen wurden diese sehr kurz im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15 ml Mehrzweckröhrchen überführt und mit 5 ml Medium resuspendiert. Dies wurde für 5 min bei 120 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. Um die Zellen nicht unnötig lange in Kultur zu halten, wurden sie unmittelbar nach den Versuchen eingefroren. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen abtrypsiniert. Um diese Reaktion zu stoppen, wurde 4 ml Medium hinzugegeben. Anschließend wurde diese Zellsuspension in ein 15 ml Mehrzweckröhrchen überführt und 5 min bei 120 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Cryoröhrchen gegeben. Dies konnte bei – 80 °C gelagert werden.

4.2.2 Passagierung von kultivierten Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen mit dem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden für alle Versuche unter diesen Bedingungen kultiviert. Das für die Zellen verwendete Medium lässt sich der Tabelle 35 entnehmen.

Tabelle 35: Für die Zelllinien verwendete Medien

| Zellen | Medium |
|--|----------|
| NB69, SH-EP, SK-N-FI, NLF, RH-41, NGP, NGP-LV-m-p53, NGP-LV-h-p53, HDMB3 | Medium A |
| IMR-32, IMR-32-LV-m-p53, IMR-32-LV-h-p53 | Medium B |
| WAC2, SH-EP MYCN-ER | Medium C |
| HDMB3 p53 dn | Medium D |
| NHDF | Medium E |

Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt und je nach Flaschengröße 1 ml - 2 ml Trypin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben. Nach einer kurzen Inkubation und mehrmaligem Schwenken der Flasche lösen sich die Zellen vom Flaschenboden ab. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Mediums (≥ 2 Volumenanteile der verwendeten Trypsinlösung) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15 ml Mehrzweckröhrchen überführt und für 5 min bei 120 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet im entsprechenden Medium resuspendiert. Je nach gewünschter Zelldichte wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät.

4.2.3 Induktion von 4- Hydroxytamoxifen induzierbaren Zellen

Der in den SH-EP MYCN-ER Zellen enthalten Vektor (pWZLneo-MYCN-ER) trägt die cDNA für MYCN, welche mit einer auf 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) responsiven Domäne des murinen Östrogenrezeptors gekoppelt ist. Durch die Zugabe von 4-OHT wird MYCN in den Nukleus transloziert, wo es die Transkription MYCN-regulierter Gene initiiert. Die Zellen wurden mit 200 nM (4-OHT) für 72 h induziert. Es erfolgte ein täglicher Medienwechsel (Schulte et al. 2008).

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das nächste Kapitel befasst sich mit der Durchführung von semiquantitativen PCRs und quantitativer Real-Time-PCRs sowie mit der Herstellung der dafür benötigten cDNA.

4.3.1 Gesamt RNA Isolierung aus Tumorzellen

Zunächst musste die RNA aus den Tumorzellen gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen, wie im Punkt 4.2.2 beschrieben, trypsinisiert und in ein 15 ml Mehrzweckröhrchen überführt und 5 min bei 120 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl des Lysepuffers (Roche; High Pure RNA Purification Kit) und 200 µl PBS resuspendiert. Bei RNA Isolierungen aus Zellen, die in Multi-Loch-Platten kultiviert wurden, wurde das Medium abgenommen und der Lysepuffer sowie PBS direkt auf die Zellen gegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des High Pure RNA Purification Kit (Roche). Um RNA von Zellen aus 96-Loch-Platten zu isolieren wurde das RNeasy®Micro Kit (Qiagen) verwendet. Dafür wurde in jede Vertiefung 200 µl RLT-Puffer (Qiagen), der mit DTT versetzt wurde, zugegeben. Es wurden jeweils zwei Ansätze miteinander gepoolt, um eine adäquate RNA Menge zu erhalten. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentrationen wurden mittels des NanoDrop-Messgerätes ermittelt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.2 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Um eine PCR durchführen zu können, muss zunächst die isolierte RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die Herstellung erfolgte nach Angaben des Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche. Für die Synthese wurden 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Zusätzlich wurde nach Beendigung des letzten Schrittes ein RNaseH Verdau durchgeführt. Dazu wurden 20 U RNaseH für 20 min bei 37 °C zugegeben. Der cDNA-Gehalt wurde mit Hilfe des NanoDrop-Messgerätes bestimmt und die cDNA auf 100 ng/µl verdünnt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu, spezifische Abschnitte der DNA zu vervielfältigen. Dies wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase gewährleistet. Durch den Einsatz zweier chemisch synthetisierter Oligonukleotiden, sogenannte Primer, die an die flankierenden Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz binden, verläuft die Amplifikation spezifisch. Der PCR-Prozess setzt sich aus mehreren Zyklen zusammen, wobei ein Zyklus sich in drei Schritte unterteilen lässt. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt, um die Stränge

Methoden

voneinander zu trennen (Denaturierung). Im zweiten Schritt (Annealing-Phase) wird die Temperatur primerspezifisch gewählt, so dass die Primer optimal an die komplementären Bereiche der Sequenz binden. Im letzten Schritt erfolgt die Synthese des neuen Stranges (Elongation). Die Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation führt schließlich zur Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes. Für die semiquantitative PCR werden gleichzeitig Primer für das zu analysierende DNA Fragment und Primer für ein Gen mit stabiler Expression, in diesem Fall GAPDH, eingesetzt

4.3.3.1 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen

Der Ansatz für die semiquantitative PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 36: Ansatz für semiquantitative PCR

| Komponente | Menge |
|--|-----------|
| cDNA (100 ng/μl) | 1 μl |
| 2x My Taq Red HS Red Mix | 10 μl |
| GAPDH Primer (10 pmol/μl bzw. 5 pmol/μl) | je 0,5 μl |
| Primer (20 pmol/μl) | je 0,5 μl |

ad 20 μl dest. Wasser

Angabe zur Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte lassen sich der Tabelle 37 entnehmen.

Tabelle 37: Programmeinstellung für die PCR

| Schritt | Zeit | Temp. |
|------------------------|--------|----------------------------------|
| Initiale Denaturierung | 5 min | 95°C |
| Denaturierung | 30 s | 95 °C |
| Annealing | 30 s | Abh. von Primern (s. Tabelle 38) |
| Elongation | 30 s | 72 °C |
| Finale Elongation | 10 min | 72 °C |

Für die PCR wurden abhängig von den verwendeten Primerpaaren verschiedene Annealingtemperaturen und Zyklenanzahlen verwendet, die der Tabelle 38 zu entnehmen sind. Für die semiquantitative PCR werden jeweils zwei Primerpaare gleichzeitig verwendet. Zum einen das Primerpaar für die zu untersuchende Sequenz und zum anderen GAPDH Primer als Ladekontrolle. Um zu gewährleisten, dass die amplifizierenden Fragmente nicht

Methoden

gleich groß sind und somit auf dem Agarose-Gel auf derselben Höhe liegen, wurden zwei verschiedene GAPDH Primerpaare, die zu unterschiedlich großen Amplifikaten führen, gewählt. Eine Übersicht über die verwendeten Primerkombinationen befindet sich in Tabelle 39.

Tabelle 38: Angaben zur Annealingtemperatur, Zyklenanzahl und Fragmentgrößen

| Primer | Annealing [°C] | Zyklenanzahl | Fragmentgröße [bp] |
|----------------------|----------------|--------------|--------------------|
| BAX | 60 | 35 | 258 |
| Caspase-3 | 59 | 35 | 298 |
| Caspase-8 | 59 | 35 | 184 |
| Caspase-9 | 63 | 35 | 194 |
| CCNB1 | 58,3 | 35 | 152 |
| cdk1 | 60 | 35 | 126 |
| GAPDH (gr. Fragment) | 60 | 29 | 598 |
| GAPDH (kl. Fragment) | 60 | 29 | 160 |
| MDM2 | 60 | 35 | 83 |
| p21 | 58 | 35 | 97 |
| p53 | 59 | 34 | 705 |

Tabelle 39: Angaben zu den verwendeten GAPDH Primern bei der semiquantitativen PCR

| Zielprimer | Verwendete GAPDH Primer | Primer Konz. [pmol/μl] |
|------------|-------------------------|------------------------|
| BAX | gr. Fragment | 10 |
| Caspase-3 | gr. Fragment | 5 |
| Caspase-8 | gr. Fragment | 5 |
| Caspase-9 | gr. Fragment | 5 |
| CCNB1 | gr. Fragment | 10 |
| Cdk1 | gr. Fragment | 10 |
| MDM2 | gr. Fragment | 10 |
| p21 | gr. Fragment | 10 |
| p53 | kl. Fragment | 5 |

4.3.3.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgt mittels der Agarose-Gelelektrophorese. Es wurde zunächst ein 2 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung klar war. Während der Abkühlphase wurde dem Gemisch 3 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt. Dann wurden die Gele in horizontalen Gelkammern gegossen. Um die Bandengröße abschätzen zu können, wurde 6 µl eines 100 bp Marker (Invitrogen) verwendet. Die Gelkammer wurden bei einer Spannung von 120 V angeschlossen. Nach Beendigung der Laufzeit wurde die DNA im Gel mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

4.3.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine Methode, um die bei der PCR gebildeten Produkte in Echtzeit zu verfolgen und so die DNA Menge zu quantifizieren. Vom Prinzip verläuft die qRT-PCR wie die im Punkt 4.3.3 beschriebene semiquantitative PCR. Der Unterschied zwischen den PCR Methoden ist, dass die gebildeten Produkte bei der qRT-PCR während des Laufs mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde für die Markierung der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Life Technologies) eingesetzt. SYBR Green I lagert sich in doppelsträngige DNA ein, wodurch nach jedem Elongationsschritt die Zunahme der Fluoreszenz, welche proportional zu der Zunahme der Produkte ist, detektiert wird. Es wurde zudem mit sogenannten TaqMan Sonden gearbeitet. Diese Sonden sind am 5'Ende mit einem Reporter-Farbstoff markiert und am 3'Ende befindet sich ein Quencher. Dieser sorgt dafür, dass die Fluoreszenz des Farbstoffes unterdrückt wird. Die Sonde bindet abwärts des eigentlichen Primers und wird durch die 5'Nuklease-Aktivität der TaqDNA-Polymerase abgebaut. Dadurch werden der Quencher und der Reporterfarbstoff voneinander getrennt und der Farbstoff kann fluoreszieren. Für die Analysen mit den TaqMan Sonden wurde der TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies) verwendet. Zur Detektion der Farbstoffe wurde das StepOne Plus Real-Time-PCR System von Applied Biosystems verwendet. Die relative mRNA Expression wurde anschließend mit Hilfe der $\Delta\Delta$ -CT Methode ermittelt.

4.4 Nachweis der Zellviabilität im MTT-Assay

Der Test basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen schwach gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch die mitochondriale Dehydrogenase aktiver Zellen. Die Absorption des entstandenen Formazans kann bei einer Wellenlänge von 550 nm - 650 nm photometrisch bestimmt werden. Da nur bei lebenden

Zellen die Dehydrogenasen aktiv sind, dient der Test als Maß für die Viabilität der Zellen. Für den MTT-Assay wurden die Zellen je nach Proliferationsrate in eine 96-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h entsprechend behandelt. Nach der gewünschten Zeit wurden 20 µl der MTT-Lösung hinzupipettiert. Nach weiteren 3 h im Brutschrank wurde die Lösung mit einer Kanüle abgesaugt. Im Anschluss wurden 100 µl der Solubilisierungslösung auf die Zellen pipettiert. Bei nicht adhärenenten Zellen wurde die Solubilisierungslösung direkt in das Medium gegeben. Die Platten wurden 30 min bei 80 rpm und 37 °C geschüttelt. Es folgte die Auswertung am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm

4.4.1 Bestimmung der Zellzahl

Um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde für die Versuche immer die gleiche Zellzahl gewählt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde das Zellanalysegerät Coulter Counter der Firma Beckman genutzt. Hierfür wurden die Zellen zunächst trypsiniert und zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 10 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 100 µl in eine mit 9.9 ml Elektrolytlösung gefüllte Küvette gegeben und gemessen.

4.4.2 Bestimmung des IC50-Wertes

Um die Konzentration des Inhibitors zu ermitteln, bei der die Zellviabilität bei 50 % liegt (IC50-Wert), wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen (je nach Proliferationsrate) in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 100 µl Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors ausgetauscht. Zur Kontrolle wurden zum einen Zellen in entsprechendem Medium kultiviert und zum anderen wurde eine DMSO-Kontrolle verwendet, in der die DMSO Konzentration dem DMSO Gehalt der höchsten Inhibitorkonzentration entsprach. Nach 48 h wurde der Assay abgestoppt und am ELISA-Reader vermessen. Die Kurven für die IC50-Wert Bestimmung wurden mittels GraphPad Prism® 5.0 erstellt. Zur Ermittlung des IC50-Wertes wurde eine horizontale Linie bei 50 % Zellviabilität manuell in den Graphen eingefügt. Durch den Schnittpunkt mit der Kurve konnte der IC50-Wert auf der y-Achse abgelesen werden.

4.5 Knock-down endogener RNAs durch siRNA Transfektion

Short interfering RNAs (siRNAs) sind 20-25 bp kurze RNA-Moleküle, die an komplementäre mRNA-Moleküle der Zellen binden. Die dadurch gebildete doppelsträngige RNA wird durch den RISC (RNA-induced silencing complex) abgebaut. Auf diese Weise wird die Translation der entsprechenden RNAs verhindert.

Methoden

Für die siRNA Transfektion wurden die Zellen in Multi-Loch-Platten ausgesät und solange kultiviert, bis sie eine 60 %ige Konfluenz aufwiesen. Die Transfektion erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 40: Pipettierschema für siRNA Transfektion [in µl]

| | 200 µl-Ansatz (96-Loch-Platte) | | 500 µl-Ansatz (24-Loch-Platte) | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|
| | siRNA (50 nM) | 0-Kontr. | siRNA (50 nM) | 0-Kontr. |
| siRNA (20 nM) | 0,53 | 0 | 1,32 | 0 |
| HiPerFect (Qiagen) | 1,2 | 1,2 | 3 | 3 |
| Serumfreies Medium | 98,27 | 98,8 | 195,68 | 197 |
| nach 0,5 h Medium mit 5 % FCS | 100 | 100 | 300 | 300 |

Als Kontrollen wurden die Zellen zum einen in Medium mit 5 % FCS (n.t.) kultiviert und zum anderen in 5 % Medium, dem nur Transfektionsreagenz (HiPerFect; Qiagen) zugefügt wurde (0-Kontr.). Für den Zellviabilitäts-Assay und für die RNA Isolierung wurden die Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät. In jedes dieser Vertiefungen wurden dann 200 µl des Transfektionsansatzes pipettiert. Für die Herstellung von Lysaten wurden 48-Loch-Platten verwendet. Für diese Platten wurden 500 µl des Transfektionsansatzes in jede Vertiefung gegeben. Nach 48 h wurde die Zellviabilität ermittelt und RNA sowie Lysate geerntet.

4.6 FACS basierte Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde mit Hilfe des FACS (fluorescence activated cell sorting) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Form der Durchflusszytometrie, bei der die Zellen durch eine Fluoreszenzmarkierung sortiert bzw. analysiert werden. Eine Methode zur Bestimmung der Zellzyklus ist die Bestimmung des DNA Gehaltes, was sich am einfachsten durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) umsetzen lässt. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert.

Die Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und so lange kultiviert bis sie ca. 60 % konfluent waren. Danach wurde die entsprechende Inhibitor Behandlung durchgeführt und die Zellen für die gewünschte Zeit weiter kultiviert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 300 µl Trypsin gelöst und ebenfalls in das Mehrzweckröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet mit 300 µl gekühltem PBS gelöst. Unter ständigem Vortexen wurde 700 µl eiskaltes Ethanol zupipettiert. Die Proben

wurden entweder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert oder mindestens für 1 h auf Eis gestellt. Die fixierten Zellen wurden für 5 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde ein RNase Verdau durch die Zugabe von 12,5 µl RNase A (20 mg/ml) für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 20 µl Propidiumiodid (1 mg/ml) gefärbt und direkt am FC500 CXP Durchflusszytometer (Beckman Coulter) vermessen und analysiert.

4.7 Immunodetektion von Proteinen

Bei der Immunodetektion von Proteinen werden die aus den Zellen gewonnenen Proteine, zunächst mittels der SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt und dann mit Hilfe des Semi-Dry-Blot Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Proteine können so durch die Bindung spezifischer Antikörper markiert werden. Zunächst verwendet man einen Erstantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet und dann einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Durch eine Chemilumineszenzreaktion können die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

4.7.1 Zellyse

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und RIPA-Puffer, welcher mit Proteasen- und Phosphatasen-Inhibitoren versetzt wurde, auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers oder einer Pipettenspitze vom Boden der Zellkulturflasche oder der Multi-Loch-Platte gelöst. Das Zelllysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

4.7.2 Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der Lysate zu bestimmen, wurde eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt. Zunächst wurde eine Standardkurve ermittelt. Das dazugehörige Pipettierschema lässt sich der Tabelle 41 entnehmen.

Tabelle 41: Pipettierschema für die BSA-Standardreihe

| | Protein [µg] | | | | | |
|--------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 0,2 µg/µl BSA [µl] | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| PBS [µl] | 800 | 790 | 780 | 770 | 760 | 750 |

Zu den Ansätzen wurde je 200 µl Bradford Reagenz zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden die Proben photometrisch vermessen. Die so erstellte Standardkurve wurde in das Gerät eingespeichert. Von den Lysaten wurden je 3 µl zu 797 µl PBS gegeben. 10 min nach Zugabe des Bradfordreagenzes wurden die Proben vermessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichgerade bestimmt.

4.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine auf Grund ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Sammelgel aufgegossen, in das ein Kamm eingeführt wurde, um Taschen für die Proben zu erstellen. Die Zusammensetzung der Chemikalien lässt sich der Tabelle 42 entnehmen.

Tabelle 42: Zusammensetzung für 2 SDS-Gele (1,5 mm)

| Bestandteile | Trenngel | | | | Sammelgel |
|------------------------|----------|--------|--------|--------|-----------|
| | 8 % | 10 % | 12 % | 14 % | (4 %) |
| Wasser | 9,6 ml | 8,4 ml | 7 ml | 5,6 ml | 4,96 ml |
| 4 x TrisCl/SDS; pH 8,8 | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | - |
| 4 x TrisCl/SDS; pH 6,8 | - | - | - | - | 1 ml |
| Acrylamid (30 %) | 5,4 ml | 6,6 ml | 8 ml | 9,4 ml | 1,04 ml |
| APS (10 %) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 40 µl |
| TEMED | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl |

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingebaut und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Das Lysat wurden mit 4 x SDS-Page Ladepuffer vermischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Ein Gesamtvolumen von je 28 µl wurde in die Taschen pipettiert. Um die Proben in das Gel einlaufen zulassen wurde eine Spannung von 80 V gewählt. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

4.7.4 Western Blot

Bei diesem Verfahren werden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose übertragen. Zum Blotten wurde das Semi-Dry-Verfahren verwendet. Dabei wurden zunächst zwei Lagen von dem in Anode2-Puffer getränkten Elektrodenpapier und eine weitere Lage in dem in Anode1-Puffer getränkten Elektrodenpuffers auf die Elektrode gelegt. Auf diese Lage wurde die in methanolhaltigen Puffer (Anode 1) aktivierte Membran auf die Elektrode gelegt. Darauf wurden das Gel und wiederum drei in Kathoden-Puffer getränkte Lagen Elektrodenpapier gelegt. Der Transfer erfolgte bei 100 mA für 70 min. Die Proteine wandern dabei aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden so auf die Membran übertragen. Um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt (s. 4.7.5). Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in einer 5 %igen Milchkpulver- oder BSA-Lösung blockiert. Danach wurde ü.N bei 4 °C mit dem Erstantikörper, verdünnt in der entsprechenden Blockierlösung, inkubiert. Angaben zur Erstantikörperverdünnungen sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran eine weitere Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper (1:2000) inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal mit PBST für 10 min gewaschen. Die Banden auf der Membran wurden mit Hilfe einer Lumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Dazu wurde die ECL-Lösung (GE Healthcare) in ausreichenden Mengen auf die Membran gegeben und die Banden mit Hilfe eines Lumineszenz-Entwicklungsgerät (Photochem) detektiert.

4.7.5 Ponceau Färbung

Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Die Membran wurde dazu für wenige Sekunden in der Ponceau-Lösung gefärbt. Nach dem Abschütten der Lösung wurde die Membran mehrmals mit dest. Wasser gewaschen, bis die Membran bis auf die Proteinbanden entfärbt war.

4.8 Immunozytochemische Färbung

Um die Lokalisation von cdk1 und CCNB1 zu untersuchen wurde eine immunozytochemische Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf einen Objektträger mit einem Zwei-Kammern-System ausgesät. Wenn die Zellen ca. 80 % konfluent waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 15 min mit vorgewärmten 4 %igen PFA bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert, indem die Zellen dreimal mit PBS/T für 5 min behandelt wurden. Es folgte die Auftragung des Erstantikörpers, welcher in PBS/T 1:100 verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 4 °C auf einem Kippschüttler. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS/A gewaschen. Es folgte die Inkubation des Zweitantikörpers (1:1000) in PBS/A unter Lichtausschluss für eine weitere Stunde bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS/A gewaschen. Die DAPI-Stocklösung (1 mg/ml) wurde 1:1000 in Methanol verdünnt und für 1 min auf die Zellen gegeben. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Immumount (Fischer Scientific) eingedeckelt.

4.9 Nachweis des Zelltodes mittels eines photometrisch basierten Assays

Um den Zelltod nachzuweisen, wurde das Cell Death Kit Plus (Roche) verwendet. Der Assay ist in der Lage, zytoplasmatische Histon-assoziierte DNA Fragmente nachzuweisen. Die Zellen wurden dazu auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und für 48 h mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Farbreaktion wurde bei jedem Versuch nach 10 min abgestoppt und am ELISA-Reader vermessen.

4.10 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität

Die Aktivität der Mitochondrien wurde mit Hilfe von Mitotrackern (Invitrogen) analysiert. Bei Mitotrackern handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe, die von aktiven Mitochondrien aufgenommen werden können.

Die Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und mit den entsprechenden IC₅₀_{48h}-Werten des cdk1-Inhibitors (RO3306) für 24 h behandelt. Hiernach wurden die 1 mM Mitotracker-Stocklösung 1:1000 in Medium verdünnt. Davon wurden jeweils 100 µl in das Medium, der auf der 12-Loch-Platte kultivierten Zellen, pipettiert. Die Zellen wurden für 1 h zurück in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Medium in ein 15 ml Mehrzweckröhrchen überführt und die auf der Platte verbliebenen Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 300 µl Trypsin/EDTA vom Boden gelöst und in die

Mehrzweckröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 120 g wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte unverzüglich am FACS-Gerät.

4.11 Bestimmung der Caspase-8 und -9 Aktivität

Zur Ermittlung der Caspase-Aktivität wurde der Caspase-8 Glo-Assay bzw. der Caspase-9 Glo-Assay von Promega verwendet. Die Zellen wurden dafür auf weißwandige 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde der cdk1-Inhibitor ($IC_{50_{48h}}$) auf die Zellen gegeben. Der Assay wurde nach weiteren 24 h und 48 h nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Platten wurden 3 h nach Zugabe der Reagenzien am ELISA-Reader vermessen.

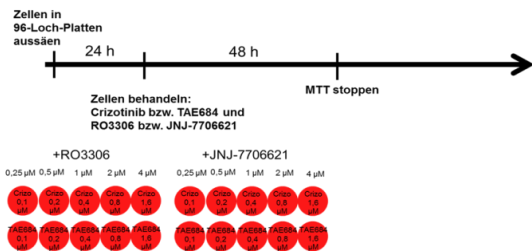
4.12 Blockierung der RO3306 vermittelten Apoptose durch Inhibition von Caspasen

Um die Rolle von Caspasen in dem vom cdk1-Inhibitor (RO3306) ausgelösten Apoptosesignalweg zu untersuchen, wurden die Zellen in Multi-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit der entsprechenden $IC_{50_{48h}}$ Konzentration des cdk1-Inhibitors und mit 12,5 µM eines pan Caspase-Inhibitors (Q-VD.OPh, Nicht O-methyliert; Calbiochem) behandelt. Nach weiteren 48 h wurden ein Cell Death ELISA (4.10) und eine FACS basierte Zellzyklusanalyse (4.6) durchgeführt.

4.13 Kombinationstherapie aus cdk-und ALK-Inhibitoren

Um zu überprüfen, welchen Effekt die duale Inhibition von cdk und ALK auf die Zellviabilität hat, wurden die Zellen entweder simultan oder nacheinander mit cdk-Inhibitoren (RO3306 und JNJ-7706621) und ALK-Inhibitoren (Crizotinib und TAE684) behandelt. Das Behandlungsschema lässt sich der Abbildung 3 entnehmen.

Simultane Behandlung



Sukzessive Behandlung

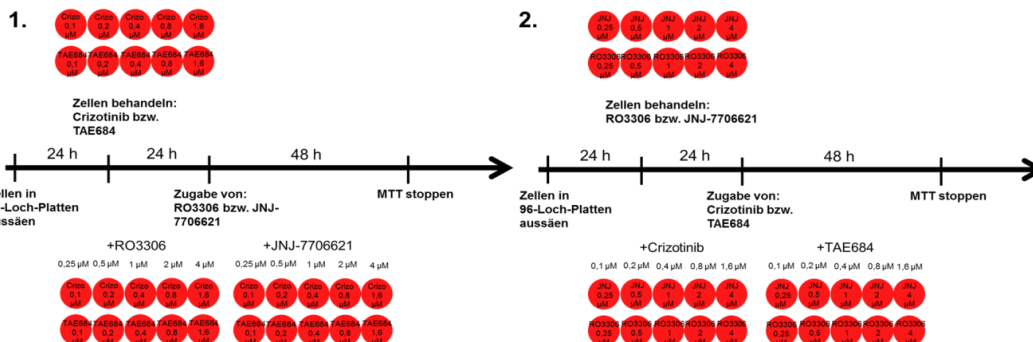


Abbildung 3: Behandlungsschema für die Kombinationstherapie aus cdk- und ALK-Inhibitoren. Die Zellen wurden entweder simultan oder sukzessiv mit den cdk-Inhibitoren RO3306 bzw. JNJ-7706621 (JNJ) und den ALK-Inhibitoren Crizotinib (Crizo) bzw. TAE684 behandelt.

Die verwendeten Konzentrationen und Kombinationen lassen sich der Tabelle 43 entnehmen. Die Effekte wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Für die Auswertung der Kombinationstherapien wurde die frei erhältliche Software ComboSyn (www.combosyn.com) von T.C Chou verwendet (Chou 2006). Die Software gibt Auskunft darüber, ob die Kombinationstherapie einen synergistischen, einen additiven oder einen antagonistischen Effekt auf die Zellviabilität hat.

Tabelle 43: Konzentrationsangaben der einzelnen Inhibitoren und der Kombinationen

| Inhibitor | Konz. [µM] | Inhibitor | Konz. [µM] | Inhibitor | Konz. [µM] |
|------------------------|------------|-------------------|------------|--|------------|
| JNJ-7706621 /RO3306 | 0,25 | Crizotinib/TAE684 | 0.1 | JNJ-7706621/RO3306 +TAE684/Crizotinib | 0,25+0,1 |
| | 0,5 | | 0,2 | | 0,5+0,2 |
| | 1 | | 0,4 | | 1+0,4 |
| | 2 | | 0,8 | | 2+0,8 |
| | 4 | | 1,6 | | 4+1,6 |

Die Einstufung wurde nach den Werten des Kombinationsindex (CI) vorgenommen. Der Tabelle 44 sind die Deutung der entsprechenden Kombinationsindices zu entnehmen.

Tabelle 44: Kombinationsindex und seine Bedeutung (Chou 2006)

| Kombinationsindex (CI) | Bedeutung |
|------------------------|---------------------------|
| <0,1 | Sehr stark synergistisch |
| 0,1-0,3 | Stark synergistisch |
| 0,3-0,7 | Synergistisch |
| 0,7-0,85 | Mäßig synergistisch |
| 0,85-0,90 | Leicht synergistisch |
| 0,90-1,10 | Nahezu Additiv |
| 1,10-1,20 | Leicht antagonistisch |
| 1,20-1,45 | Mäßig antagonistisch |
| 1,45-3,3 | Antagonistisch |
| 3,3-10 | Stark antagonistisch |
| >10 | Sehr stark antagonistisch |

4.14 Statistische Auswertungen

Die in den Graphen gezeigten Fehlerbalken entsprechen errechneten SEM (standard error of the mean)-Werten. Statistische Auswertungen wie der t-Test wurden mit Hilfe von GraphPad Prism® 5.0 durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden wie folgt angegeben: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

5. Ergebnisse

Eines der von Hanahan und Weinberg beschriebenen „Hallmarks of Cancer“ ist die Aufrechterhaltung der Zellproliferation in Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2011). Zellzyklusregulatoren, wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (cdk) spielen eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation. Eine Korrelation zwischen einer erhöhten cdk- bzw. Cyclin-Expression und einer schlechten Überlebensrate konnte für unterschiedliche Tumorentitäten gezeigt werden (Aaltonen et al. 2009; Hoffmann et al. 2011). Daher wird in den nächsten Kapiteln die Bedeutung von Cyclinen und cdk im Neuroblastom näher untersucht.

5.1. Korrelation zwischen der cdk- bzw. Cyclin-Expression und dem Verlauf der Krankheit sowie dem MYCN-Status

Um eine Aussage über die Bedeutung der Zellzyklusregulatoren zu treffen, wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von cdk bzw. Cyclinen und dem Verlauf der Krankheit bzw. dem MYCN Status im NB mit Hilfe von Exon Array Analysen primärer NB unter Einsatz des Programms R2 (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) überprüft. Dazu wurde ein Datensatz aus 101 Neuroblastomen verwendet (Eschenburg et al. 2012). Die Tumore stammen aus Tumordatenbanken aus Essen (Deutschland) und Ghent (Belgien). Die Kaplan-Meier Kurven lassen darauf schließen, dass die Expression von cdk1 ($p=2,3 \cdot 10^{-4}$), cdk2 ($p=6,1 \cdot 10^{-3}$), cdk4 ($p=3,2 \cdot 10^{-3}$) und cdk6 ($p=0.045$) sowie CCNA1 ($p=0,08$), CCNB1 ($p=8,1 \cdot 10^{-4}$), CCND1 ($p=0,121$) und CCNE1 ($p=2,8 \cdot 10^{-5}$) mit einem schlechten Verlauf der Krankheit verknüpft sind (Abbildung 4 a, c, e). Diese Korrelation scheint unabhängig vom MYCN Status der Tumore zu sein, wie man anhand der Kaplan-Meier Kurven, bei denen nur die Tumore ohne MYCN Amplifikation einbezogen sind, deutlich erkennen kann (Abbildung 4 a, c, e). Alle analysierten cdk sind tendenziell in Tumoren mit MYCN Amplifikation höher exprimiert (Abbildung 4 b, d, f). Signifikant ist diese Korrelation jedoch nur bei cdk1 ($p=7,6 \cdot 10^{-4}$) und cdk4 ($p=1,9 \cdot 10^{-4}$). Bei den Cyclinen sind nur CCNB1 ($p=3,8 \cdot 10^{-4}$) und CCNE1 ($p=3,01 \cdot 10^{-4}$) in den MYCN amplifizierten Tumoren höher exprimiert als in den nicht MYCN amplifizierten Tumoren. Interessant ist, dass sowohl cdk1 als auch der dazugehörige Interaktionspartner CCNB1 in Tumoren mit MYCN Amplifikationen hochreguliert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und dem Hintergrund, dass der cdk1/CCNB1 Komplex im Neuroblastom kaum untersucht worden ist, haben wir uns dafür entschieden, diesen Komplex näher zu untersuchen.

Ergebnisse

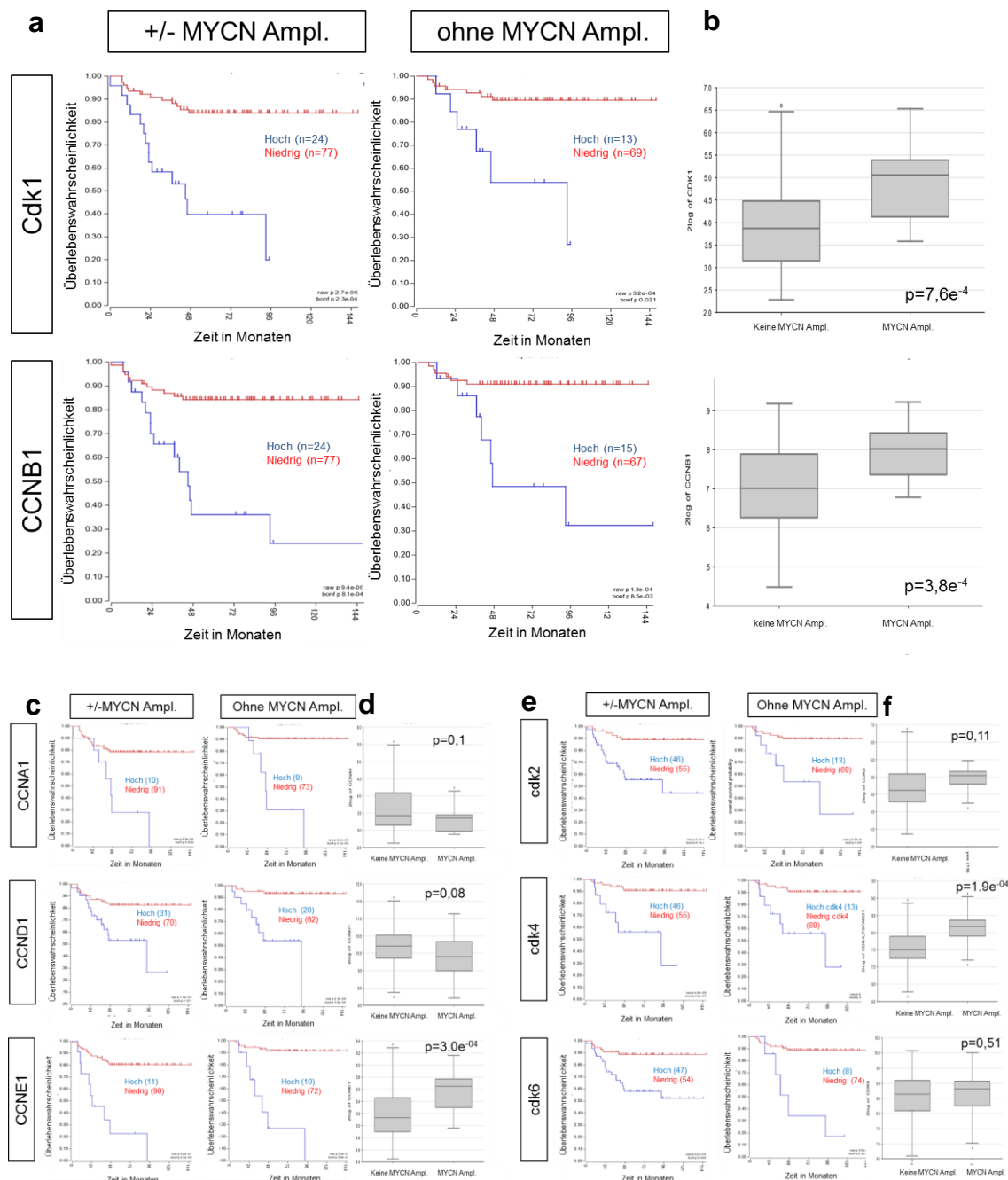


Abbildung 4: Korrelation zwischen cdk- und Cyclin mRNA-Expression und dem Gesamtüberleben bzw. MYCN Status im Neuroblastom. Kaplan-Meier Kurven zeigen die Korrelation zwischen der Expression von cdk1, cdk2, cdk4 und cdk6 bzw. CCNA1, CCNB1, CCND1 und CCNE1 und dem Gesamtüberleben zum einen für alle 101 Neuroblastompatienten (+/-MYCN Ampl.) und zum anderen nur für Patienten ohne MYCN Amplifikation (ohne MYCN Ampl.) im Tumor (a, c, e). Die hier gewählte Einteilung in „Hoch“ und „Niedrig“ maximiert die Unterschiede zwischen diesen Gruppen, die p-Werte sind entsprechend für multiples Testen korrigiert. Die Box-Plots zeigen den Zusammenhang zwischen der Expression und der MYCN Amplifikation (b, d, e). (Generiert in R2 <http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>)

5.2 Expression von cdk1 und CCNB1 in NB Zelllinien

Um eine Überexpression in Neuroblastomzelllinien und eine mögliche Korrelation zwischen der cdk1 bzw. CCNB1 Expression und MYCN zu bestätigen, wurde die Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Neuroblastomzelllinien bzw. einer Rhabdomyosarkom-Zelllinie (RH-41) untersucht.

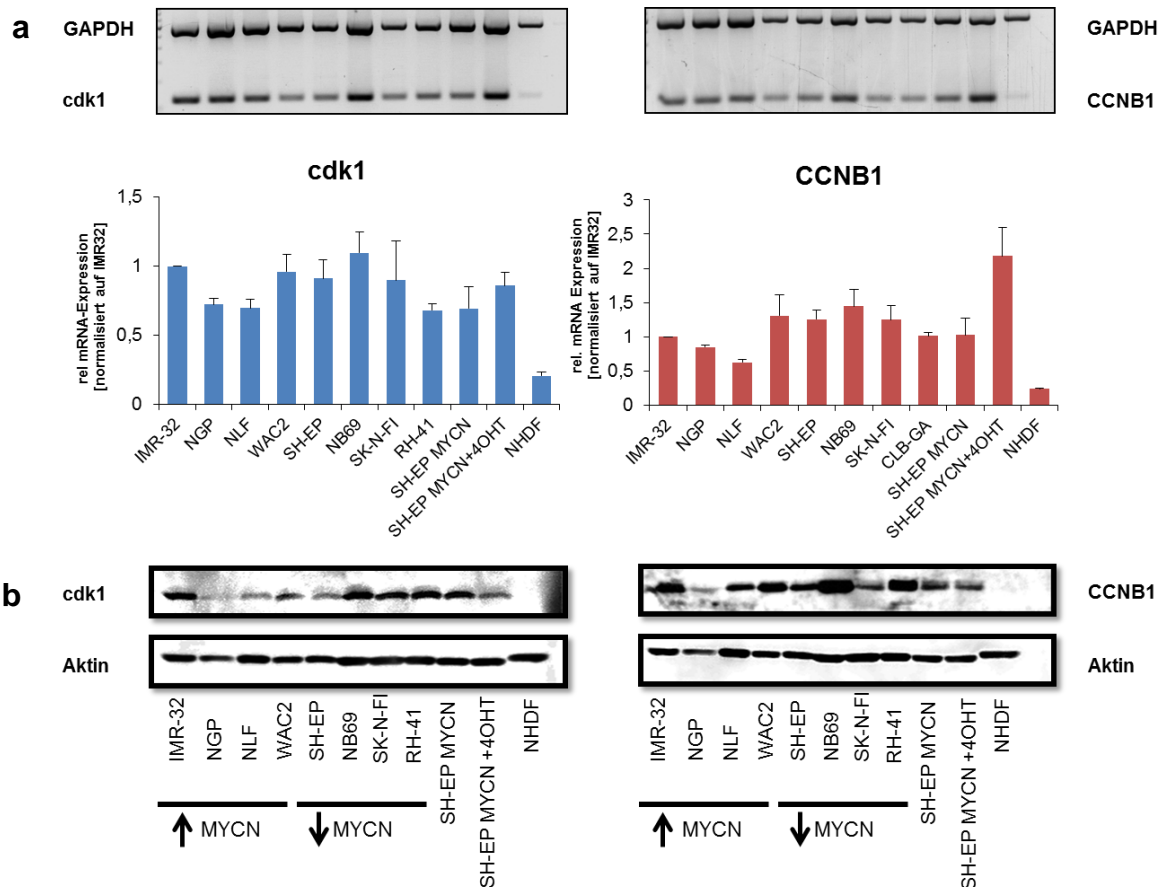


Abbildung 5: Expression von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien.

Die Expression von cdk1 und CCNB1 wurde auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR (a), sowie auf Proteinebene mittels Western Blots (b) bestimmt. Die Expression wurde in Zelllinien mit hohen MYCN-Leveln/-Amplifikation (IMR-32, NGP, NLF und WAC2) und wenig MYCN (SH-EP, NB69, SK-N-FI und RH-41), sowie im SH-EP MYCN-ER System vor und nach Induktion untersucht. Zusätzlich wurde eine nicht tumorigene Zelllinie (NHDF) getestet (a, b).

Die PCRs und die Western Blots zeigen, dass sowohl die mRNA- als auch die Proteinlevel von cdk1 und CCNB1 in allen getesteten NB Zelllinien über den der nicht tumorigenen humanen Fibroblastenzelllinie, NHDF, liegen (Abbildung 5). Es wurden sowohl Zellen mit MYCN Amplifikation bzw. Überexpression (NGP, NLF, IMR-32, WAC2) und geringen MYCN-Leveln (NB69, NLF, RH-41) getestet. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen MYCN und der Expression der beiden Zellzyklusregulatoren nachgewiesen werden. Die mRNA-Level sind allerdings in den ektopisch MYCN exprimierenden WAC2 Zellen im Gegensatz zu den parentalen SH-EP Zellen leicht erhöht. Dieser Trend zeigt sich auch in dem SH-EP MYCN-ER induzierbaren System. Auf Proteinebene kann dieser Trend nur in den stabil transfizierten Zellen (WAC2) bestätigt werden.

5.3 Lokalisation von CCNB1 bzw. cdk1 mittels immunozytochemischer Untersuchungen

Um die Lokalisation von cdk1 und CCNB1 in den Zellen zu überprüfen, wurden immunozytochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden zum einen cdk1 bzw. CCNB1 (Abbildung 6: Lokalisation von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien. Abbildung 6) und der Zellkern mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (4.8). Die Färbungen zeigen, dass beide Gene hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Der Kern ist nur in einigen Zellen stark angefärbt. In den anderen Zellen ist der Kern nur schwach bis gar nicht gefärbt. Einen Unterschied zwischen den Zelllinien lässt sich nicht feststellen.

Ergebnisse

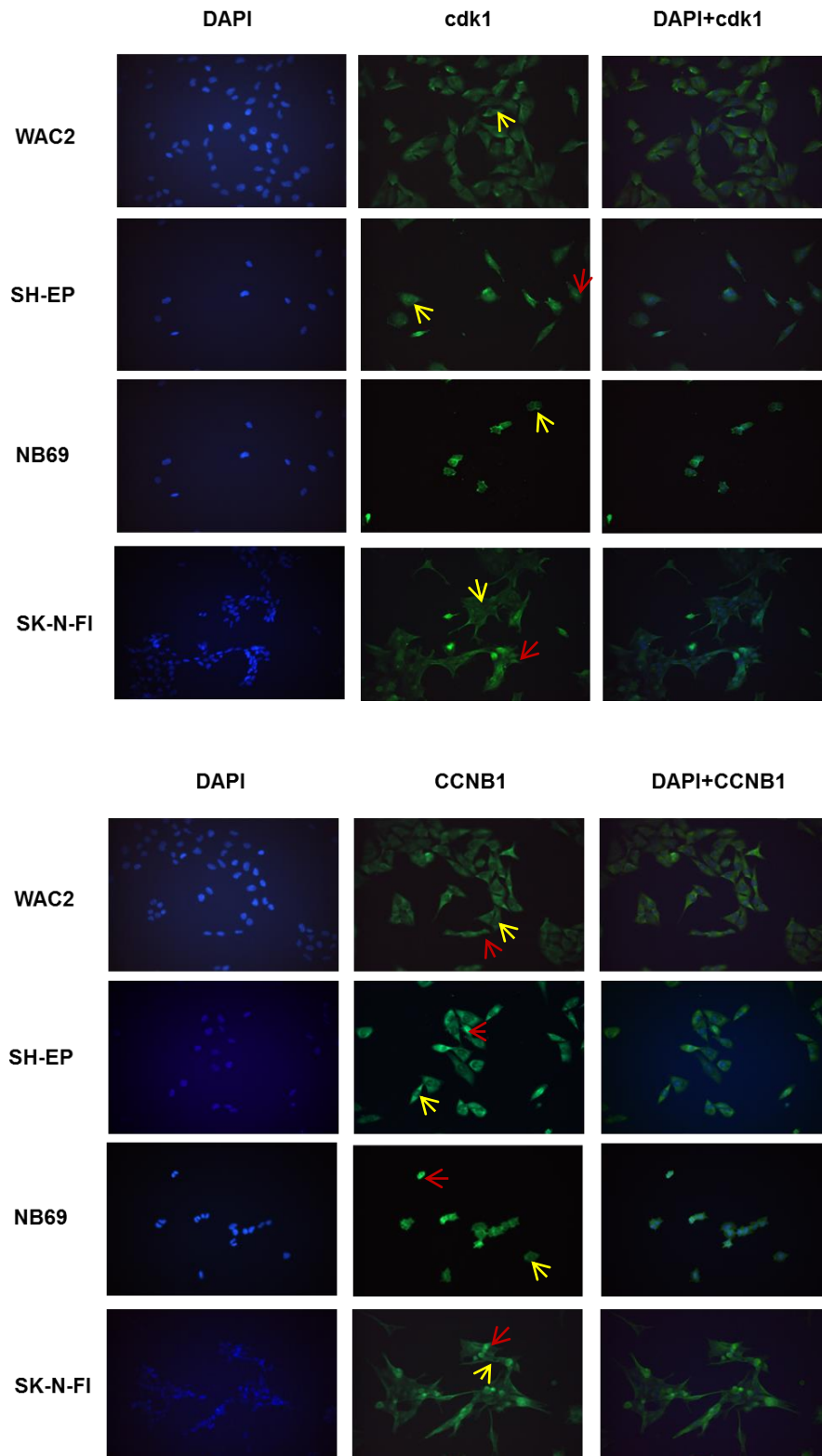


Abbildung 6: Lokalisation von cdk1 und CCNB1 in Neuroblastomzelllinien. Die Bilder zeigen Färbungen von cdk1 bzw. CCNB1 (grün) und des Zellkernes (blau) in Neuroblastomzelllinien. Die beiden Bilder wurden übereinander gelegt, um eine bessere Lokalisation zu ermöglichen (DAPI+cdk1; DAPI+CCNB1). Die gelben Pfeile zeigen beispielhaft Zellen, bei denen cdk1 bzw. CCNB1 zytoplasmatisch angefärbt ist. Die roten Pfeile deuten eine Lokalisation von cdk1 bzw. CCNB1 im Zellkern an.

5.4 Charakterisierung des siRNA vermittelten Knock-downs von cdk1 bzw. CCNB1

Um den Einfluss von cdk1 und CCNB1 in NB Zellen zu untersuchen, wurde die Expression durch den Einsatz von short interfering RNAs (siRNAs) herunterreguliert (4.5). Das folgende Kapitel gibt Aufschluss über die erzielte knock-down Effizienz und den Einfluss auf die Zellproliferation.

5.4.1 Knock-down Effizienz

Die Zellen wurden für 48 h mit 50 nM siRNA gegen cdk1 bzw. CCNB1 (CCNB1_a und CCNB1_b) behandelt. Zur Kontrolle wurden die Zellen zum einen nur mit dem Transfektionsreagenz (HighPerFect; Qiagen) und zum anderen mit einer Negativ-Kontroll-siRNA behandelt. Die mRNA-Level, die mittels Real-Time-PCR ermittelt wurden, konnten in allen Zelllinien signifikant verringert werden. Bei den SH-EP Zellen konnte die stärkste Herunterregulation erzielt werden. Hier konnte die Expression bei cdk1 auf 24 % gesenkt werden. In den WAC2 Zellen lag die Expression 48 h nach der Transfektion bei 45 %, in den NB69 Zellen bei 37 % und in den SK-N-FI Zellen bei 41 %. In den NLF Zellen lag die cdk1-Expression noch bei 57 % (Abbildung 7 a). Für die CCNB1 Herunterregulation wurden zwei siRNAs (CCNB1_a und CCNB1_b) verwendet. Die siRNAs unterscheiden sich lediglich in der Region, an der sie an die mRNA binden. Beide siRNAs zeigten ähnliche knock-down Effizienzen. Auch bei diesen Transfektionen sprachen die SH-EP Zellen am besten auf die Behandlung an. Hier konnte die Expression auf 34 % bzw. 33 % verringert werden. Bei den anderen Zelllinien konnte eine Verringerung der mRNA-Level auf 40-61 % (siCCNB1_a) bzw. 47-61 % (CCNB1_b) erreicht werden (Abbildung 7 a). Auch auf Proteinebene zeigte sich nach 48 h eine Verringerung der Expressionslevel. Die geringste Herunterregulation auf Proteinebene wurde für NB69 beobachtet (Abbildung 7 b). Sowohl das Transfektionsreagenz als auch die Negativ-Kontroll-siRNA beeinflussten die mRNA-Level von cdk1 bzw. CCNB1 nicht signifikant und auch auf Proteinebene war kein bedeutender Unterschied zu den unbehandelten Proben zu erkennen.

Ergebnisse

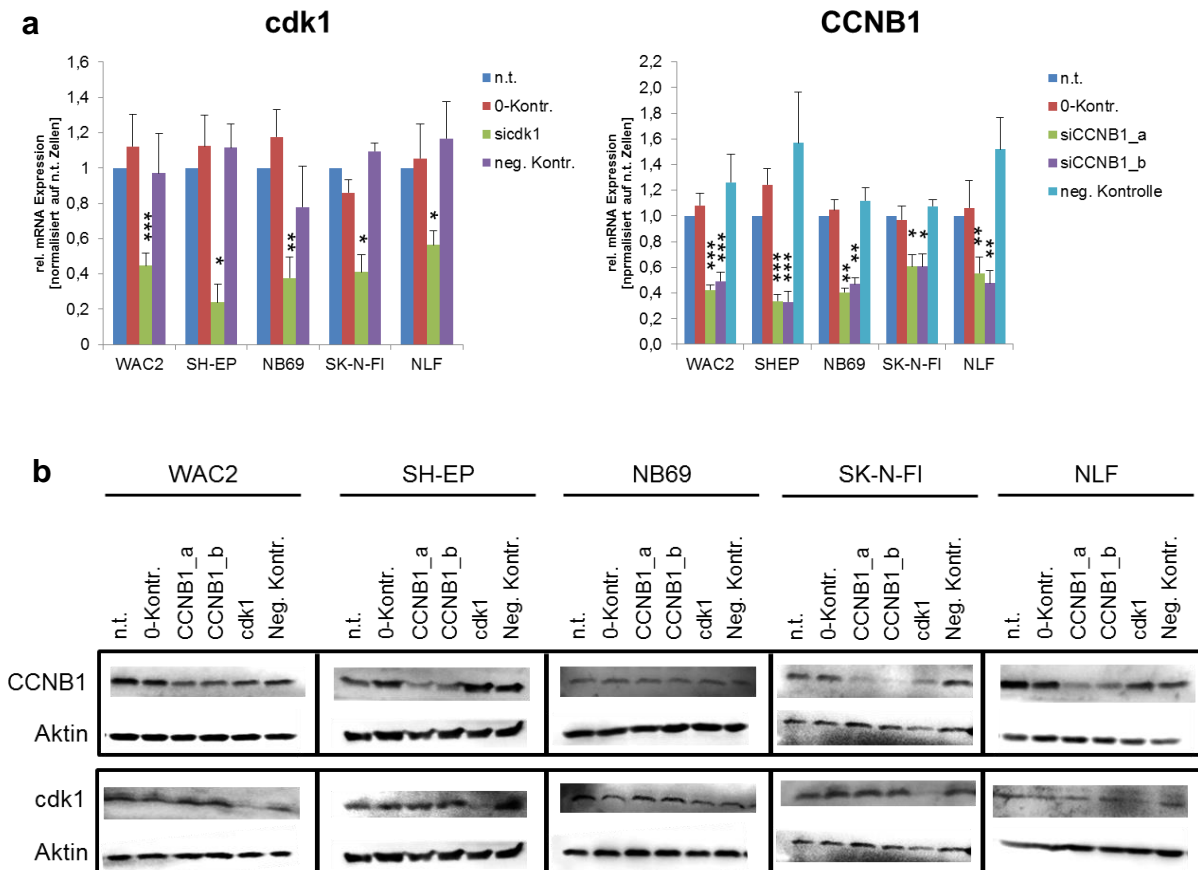


Abbildung 7: siRNA vermittelte Herunterregulation von cdk1 bzw. CCNB1 auf mRNA- und Proteinebene. Der Knock-down von cdk1 (sicdk1) bzw. CCNB1 (siCCNB1_a und siCCNB1_b) wurde auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR (a) und auf Proteinebene mittels Western Blots bestimmt (b).

5.4.2 Einfluss des cdk1/CCNB1 Knock-downs auf die Zellviabilität

Die Runterregulation von cdk1 bzw. CCNB1 mittels siRNA Transfektion hatte unterschiedliche Effekte auf die Zellproliferation. Die stärksten Effekte wurden für die WAC2- und SH-EP Zellen beobachtet. Die Herunterregulation von CCNB1 verringerte die Zellviabilität im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen bei WAC2 um ca. 40 % und bei den SH-EP Zellen um ca. 50 %. Durch die Runterregulation von cdk1 wurde die Zellviabilität in den WAC2 Zellen um ca. 25 % verringert und in den SH-EP Zellen um 40 %. Diese beiden Zelllinien reagieren auch am empfindlichsten auf das Transfektionsreagenz und die Negativ-Kontroll-siRNA. Bei der Zelllinie SK-N-FI erzielte die Herunterregulation von CCNB1 lediglich eine Verringerung der Zellproliferation zwischen 7 % und 12 %. Die Herunterregulation von cdk1 hatte sogar überhaupt keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Ein Zusammenhang

Ergebnisse

zwischen der Zellviabilität der knock-down Zellen und dem MYCN Status konnte nicht beobachtet werden.

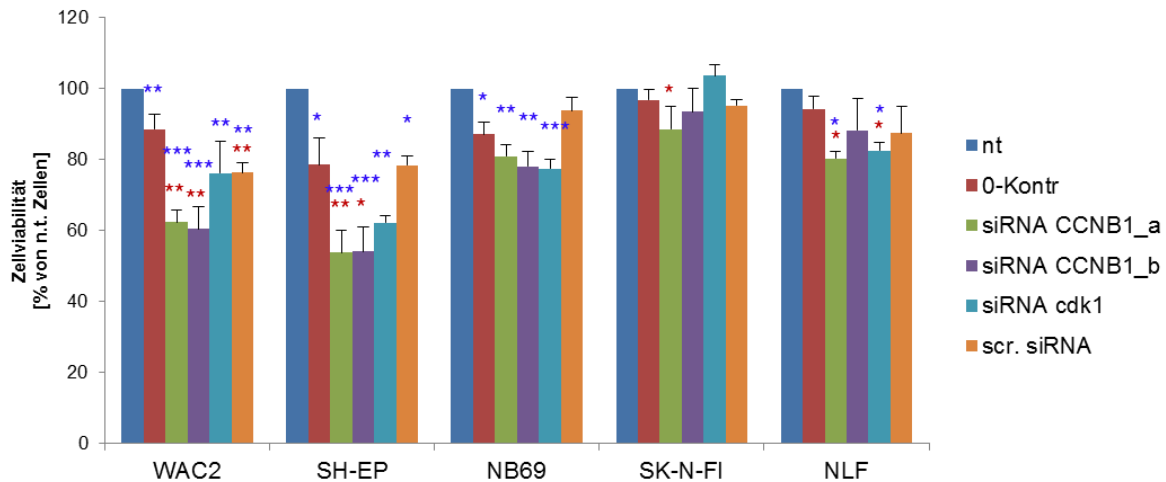


Abbildung 8: Einfluss von RO3306 auf die Zellviabilität. Dargestellt ist die Zellviabilität nach 48 h für nicht transfizierte Zellen (n.t.), für Zellen, die mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (0-Kontr.) und für Zellen, die mit den CCNB1- bzw. cdk1-siRNA (50 nM) behandelt wurden. Die blauen Sterne (*) geben den signifikanten Unterschied zwischen n.t. und behandelten Zellen an. Die roten Sterne (*) verweisen auf die Signifikanzen zwischen 0-Kontr. und siRNA behandelten Zellen (***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$).

5.5 Charakterisierung der molekularen Wirkung von cdk-Inhibitoren (RO3306 und JNJ-7706621) in Neuroblastomzelllinien

Um cdk1 als therapeutisches Zielgen weiter zu untersuchen, wurde zum einen ein cdk1 spezifischer Inhibitor, RO3306, und zum anderen ein pan cdk-Inhibitor, JNJ-7706621, mit hoher Affinität für cdk1 und cdk2, eingesetzt. Die nächsten Kapitel befassen sich daher mit der Charakterisierung dieser Inhibitoren. Das Augenmerk liegt hierbei vor allem auf der Untersuchung des spezifischen cdk1-Inhibitors.

5.5.1 Einfluss von cdk-Inhibitoren auf die Proliferation von NB Zellen

Im ersten Schritt wurden die Effekte des cdk1-Inhibitors, RO3306, und des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621, auf die Zellviabilität in fünf Neuroblastomzelllinien (NB69, SH-EP, WAC2, SK-N-FI, NLF) und im SH-EP MYCN-ER System getestet und die $IC_{50_{48h}}$ -Werte bestimmt.

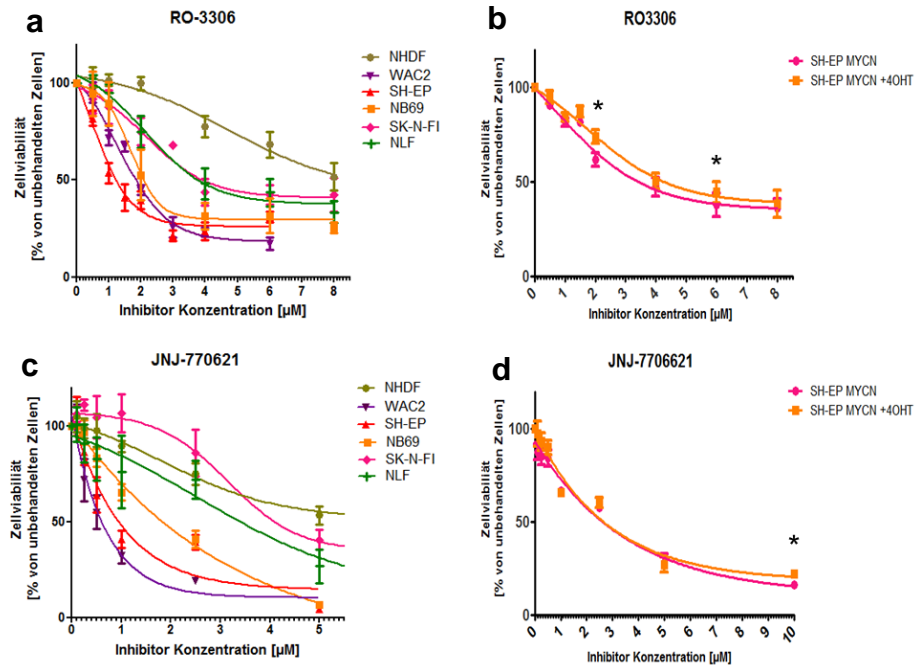
5.5.1.1 Einfluss des cdk1 Inhibitors, RO3306, auf die Zellviabilität

Zunächst wurde der Einfluss des cdk-Inhibitors (RO3306) auf die Zellviabilität von Neuroblastomzelllinien (NB69, SH-EP, WAC2, SK-N-FI, NLF) mit Hilfe eines MTT- Assays (4.4.3) ermittelt und die IC₅₀-Werte bestimmt (4.4.3.2). Um die Wirkung des Inhibitors auf nicht tumorigene Zellen zu untersuchen, wurde die humane Fibroblastenzelllinie (NHDF) eingesetzt. Die Auswertung des MTT-Assays zeigte nach 48 h eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität. Die NB Zellen zeigten sich deutlich resistenter als die humane Fibroblastenzelllinie (NHDF). Bei der höchsten eingesetzten Inhibitor-Konzentration, die 8 µM betrug, lag die Zellviabilität der Fibroblasten noch knapp über 50 % (Abbildung 9 a). Die ektopisch MYCN exprimierende Zelllinie, WAC2 (IC₅₀_{48h}: 1,8 µM), zeigte ähnlich sensitiv wie parentale Zelllinie SH-EP (IC₅₀_{48h}: 1,3 µM). Diese Tendenz lässt sich auch im SH-EP MYCN-ER System beobachten. Bei den diesen Zellen steigt der IC₅₀_{48h}-Wert nach der MYCN-Aktivierung durch 4-OHT von 3,4 µM auf 4,2 µM (Abbildung 9 b). Ein genereller Unterschied zwischen MYCN amplifizierenden/überexprimierenden Zelllinien (WAC2, NLF) und Zelllinien mit wenig MYCN (SH-EP, NB69, SK-N-FI) konnte nicht festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass Zellen mit einer p53 Mutation (SK-N-FI, NLF) resistenter gegenüber dem Inhibitor waren als p53 wt Zellen. Die IC₅₀_{48h}-Werte (SK-N-FI: 4 µM; NLF: 3,8 µM) lagen ca. 2-mal so hoch wie bei den Zelllinien ohne p53 Mutation (SH-EP: 1,3 µM; WAC2: 1,8 µM und NB69: 2,3 µM).

5.5.1.2 Einfluss des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621, auf die Zellviabilität

Die Behandlung mit dem pan cdk-Inhibitor führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität in den fünf Neuroblastomzelllinien (WAC2, SH-EP, NB69, SK-N-FI, NLF). Hierbei liegen die IC₅₀_{48h}-Werte im unteren mikromolaren Bereich (0,6 µM-4,1 µM). Die nicht tumorigene Zelllinie (NHDF) zeigte sich auch bei diesem Inhibitor resistenter als die Neuroblastomzelllinien (Abbildung 9 c). Im getesteten Konzentrationsbereich (0,25 µM-10 µM) fiel die Zellviabilität nicht unter 50 %. Es zeigte sich, analog zur Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor, kein MYCN spezifischer Effekt auf die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor. Zwar lässt sich ein Unterschied zwischen den ektopisch MYCN exprimierenden WAC2 Zellen (IC₅₀_{48h}: 0,6 µM) und den parentalen SH-EP (IC₅₀_{48h}: 1 µM) feststellen, allerdings sind die IC₅₀_{48h}-Werte der SH-EP MYCN-ER Zellen ohne und mit 4-OHT Behandlung identisch (2,6 µM) (Abbildung 9 d). Auch bei den weiteren getesteten Zelllinien stellt sich kein MYCN-abhängiger Effekt heraus. Die IC₅₀_{48h}-Werte der p53 wt Zellen (WAC2, SH-EP und NB69) lagen zwischen 0,6 µM und 2,3 µM und somit unter denen der p53 mutierten Zellen (NLF, SK-N-FI). Hier lagen die IC_{48h}-Werte für die SK-N-FI Zellen bei 4,1 µM und für die NLF Zellen bei 3,4 µM.

Ergebnisse



| Zelllinie | RO3306 IC50 in μM | JNJ-7706621 IC50 in μM | p53- Status | MYCN-Status |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| WAC2 | 1,80 | 0,60 | wt | Überexprimiert (Schweigerer et al. 1990) |
| SH-EP | 1,30 | 1,00 | wt | wt |
| NB69 | 2,30 | 2,30 | wt | wt |
| SK-N-FI | 4,00 | 4,10 | mut. (van Maerken et al. 2006) | wt |
| NLF | 3,80 | 3,40 | mut. (van Maerken et al. 2011) | Amplifiziert (Schwab et al. 1983) |
| SH-EP MYCN | 3,40 | 2,60 | wt | Überexprimiert |
| SH-EP MYCN +4-OHT | 4,20 | 2,60 | wt | Überexprimiert/Translokation in den Zellkern (Schulte et al. 2008) |
| NHDF | >8 μM | >10 μM | wt | wt |

Abbildung 9: Die Inhibition von cdk1 verringert die Zellviabilität von Neuroblastomzellen unabhängig vom MYCN Status. Zellviabilitäts Assays für den cdk1 spezifische Inhibitor (RO3306) und den pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621). Getestet wurden fünf Neuroblastomzelllinien (WAC2, SH-EP, NB69, SK-N-FI und NLF) und eine humane Fibroblastenzelllinie (NHDF) (a, c) sowie das SH-EP MYCN-ER System (b, d). Der Tabelle sind die entsprechenden $\text{IC}_{50_{48h}}$ -Werte sowie der MYCN und p53 Status zu entnehmen. Signifikanzen zwischen den unbehandelten SH-EP MYCN-ER Zelllinien und den induzierten Zellen sind wie folgt dargestellt: *: $p=0,01-0,05$.

5.5.2 Nachweis der spezifischen cdk1 Inhibition durch RO3306

Um zu zeigen, dass der Inhibitor, RO3306, eine spezifische Inhibition auf cdk1 hat, wurde der Phosphorylierungsstatus der Protein Phosphatase 1 α (PP1 α) überprüft. PP1 α wird durch cdk1 am Threonin 320 phosphoryliert. Bei einer Inhibition von cdk1 sollte auch diese Phosphorylierung abnehmen (Kwon et al. 1997). Zusätzlich wurde eine cdk4 spezifische Phosphorylierung (Ser (807/811)) des Retinoblastom (Rb)-Proteins geprüft, um eine mögliche unspezifische Inhibierung auszuschließen (Knudsen und Wang 1996). Die Western Blots zeigen, dass nach 24 h RO3306 Behandlung keine Abnahme des phosphorylierten Rb-Proteins eintritt (Abbildung 10 a). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmenge des PP1 α Proteins an den Zeitpunkten 4 h und 8 h abnimmt, jedoch nach 24 h wieder auf das Ausgangslevel zurückkehrt (Abbildung 10 b). Bei dem phosphorylierten PP1 α ist eine Abnahme nach 4 h zu beobachten und bleibt auch 24 h nach Inhibitorbehandlung unter dem Niveau der Kontrollzellen (Abbildung 10 c).

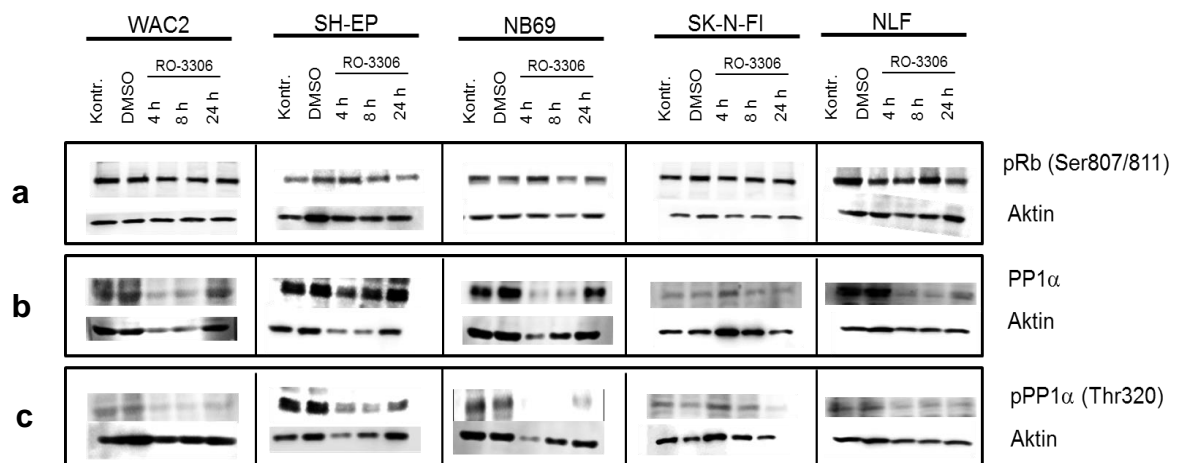


Abbildung 10: RO3306 inhibiert die enzymatische Funktion von cdk1. Western Blots zeigen die durch cdk1 phosphorylierte Form von PP1 α (Thr320) (c) und das gesamte PP1 α (b) sowie die durch cdk4 phosphorylierte Form des Retinoblastomproteins (Ser807/811) (a). Getestet wurden unbehandelte Zellen, DMSO behandelte Zellen und Zellen nach 4 h, 8 h und 24 h RO3306 Behandlung mit entsprechender IC50_{48h}.

5.5.3 Einfluss des p53 Status auf die inhibitorische Effizienz der cdk Inhibitoren

Um den in Punkt 5.5.1 gezeigten Effekt des p53 Status auf die Inhibitor Effizienz der cdk-Inhibitoren in NB Zellen zu bestätigen, wurden lentiviral mit shRNA gegen p53 transfizierte Zellen (NGP und IMR-32) getestet. Zur Kontrolle wurden die parentalen Zelllinien und lentiviral mit muriner shRNA transfizierten Zellen gegen p53 eingesetzt. Die Zelllinien wurden im Labor von Prof. Speleman in Belgien hergestellt und uns dankenswerterweise zur Verfügung gestellt (van Maerken et al. 2006). Zusätzlich wurden auch Medulloblastomzellen, die mit einer dominant negativen Form von p53 transfiziert worden sind, getestet. Diese Zellen (HDMB3 p53 dn) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. J.H. Schulte (Henssen et al. 2013) etabliert.

5.5.3.1 Charakterisierung der p53 knock-down Zellen

Durch die lentivirale Transfektion der IMR-32 und NGP Zellen mit shRNA gegen humanes p53 konnte eine Reduzierung von p53 auf Protein- und mRNA-Ebene bis zu 80 % erreicht werden (Abbildung 11 a und b). Die mit shRNA gegen murines p53 transfizierten Zellen zeigten keine Verringerung der p53-Expressionslevel. Um einen Einfluss der p53 Herunterregulation auf die cdk1- bzw. CCNB1-Expression auszuschließen, wurden diese sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Ebene untersucht (Abbildung 11 c, d). Es konnten keine veränderten Expressionslevel durch die p53 Herunterregulation aufgezeigt werden.

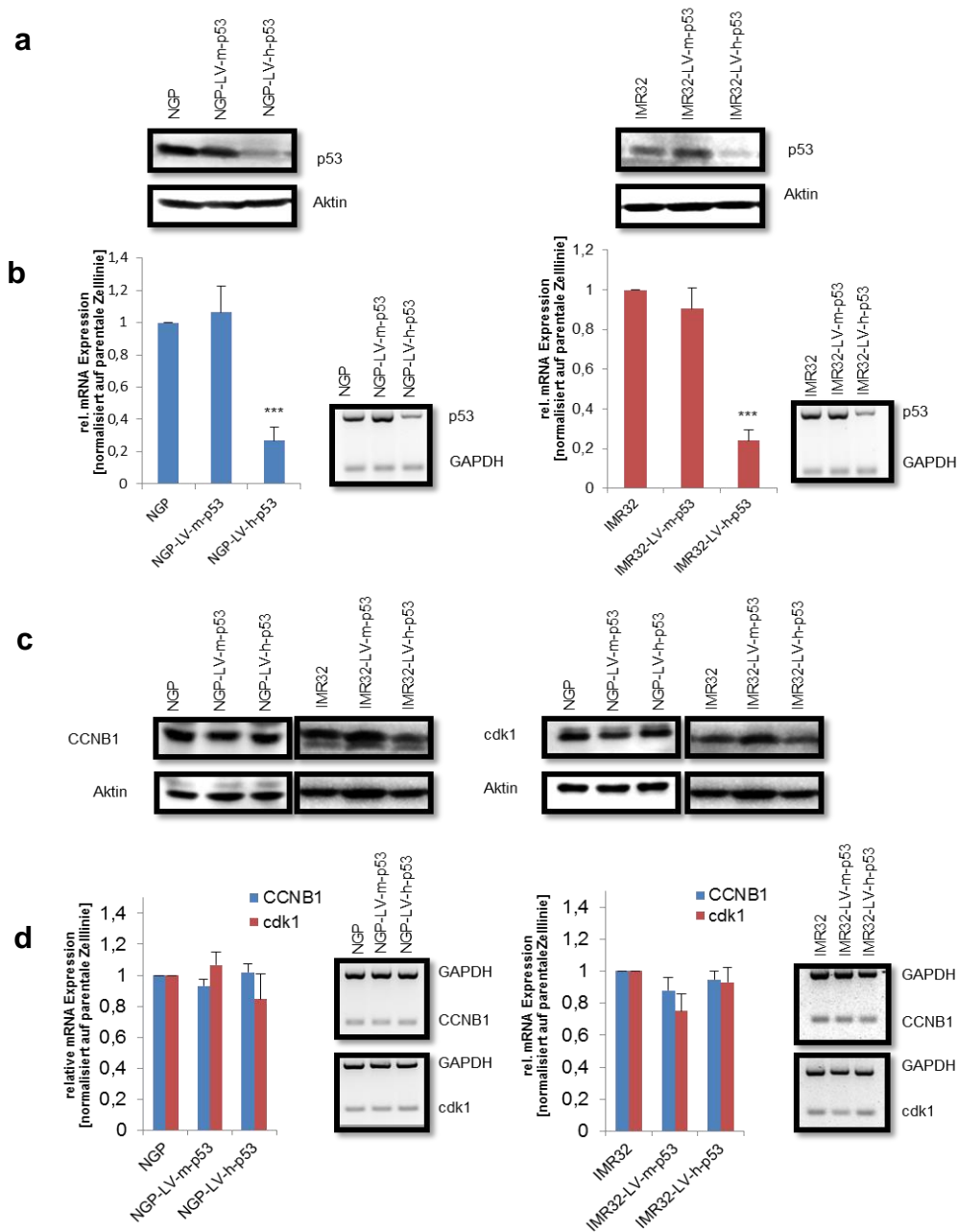
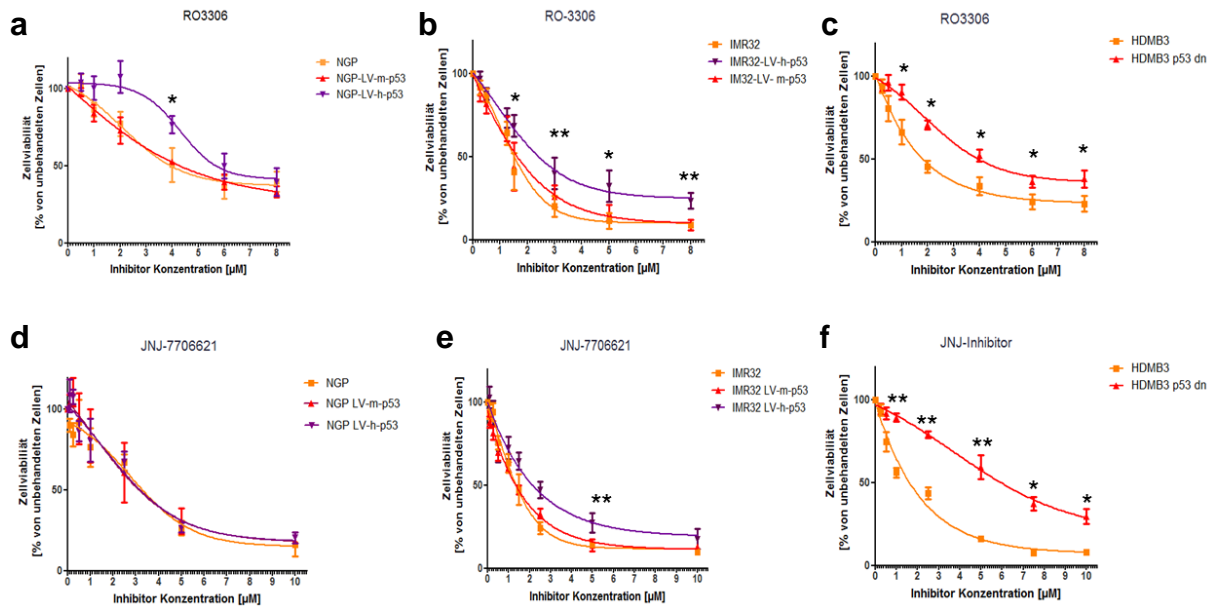


Abbildung 11: Charakterisierung der p53 knock-down Zellen. Der p53 Knock-down in den mit p53 shRNA lentiviral transfizierten Zellen konnte auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Als Kontrollzellen wurden die parental Zellen (IMR32 und NGP) sowie die mit shRNA gegen murines p53 transfizierte Zellen (IMR32-LV-m-p53 und NGP-LV-m-p53) verwendet. Die Abbildung zeigt zudem die cdk1 bzw. CCNB1 Protein- und mRNA-Level in den p53 knock-down Zellen und den dazugehörigen Kontrollzellen. Signifikanzen zwischen den parental Zellen und den transfizierten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$.

5.5.3.2 Einfluss von p53 auf die Inhibitor Effizienz von cdk-Inhibitoren

Um den Einfluss von p53 auf die Proliferationsinhibition einzuschätzen, wurde die Zellviabilität mittels eines MTT-Assays bestimmt. In beiden oben genannten Zelllinien waren die p53 knock-down Zellen resistenter gegenüber der Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor als die Kontrollen. Die $IC_{50_{48h}}$ -Werte der Kontrollzellen lagen für die IMR32 Zellen bei 1,6 μM bzw. für die NGP Zellen bei 4 μM und bei den knock-down Zellen lagen die Werte bei 2,4 μM bzw. 6 μM (Abbildung 12 a, b). Der Einfluss von p53 wurde auch beim Einsatz des pan cdk-Inhibitor in IMR-32, nicht jedoch in den NGP Zellen deutlich. In den IMR-32 Zellen wurde eine Erhöhung des $IC_{50_{48h}}$ -Wertes von 1,3 μM in den Kontrollzellen auf 2,1 μM in den p53 knock-down Zellen festgestellt, während sich in den NGP-Zellen keine Änderungen des $IC_{50_{48h}}$ -Wertes ergab (Abbildung 12 d, e). Um den Einfluss von p53 abzusichern, wurde zusätzlich eine Medulloblastomzelllinie, die mit einer p53 dominant negativen Form transfiziert wurde, getestet (Henssen et al. 2013). Hier zeigte sich, dass in Abwesenheit von funktionellem p53 der $IC_{50_{48h}}$ -Wert für RO3306 mehr als doppelt so hoch wie in den p53 negativ dominant exprimierenden Zellen war ($IC_{50_{48h}}$ HDMB3: 1,8 μM ; $IC_{50_{48h}}$ HDMB3 p53 dn: 3,9 μM) (Abbildung 12 c). Bei dem JNJ-7706621 Inhibitor lagen die $IC_{50_{48h}}$ -Werte in den p53 dominant negativen Zellen mit 6 μM zu 1,6 μM mehr als dreimal so hoch (Abbildung 12 f).

Ergebnisse



| Zelllinie | RO3306 IC50 in μM | JNJ7706621 IC50 in μM | p53-Status |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| IMR32 | 1,6 | 1,3 | wt |
| IMR32-LV-m-p53 | 1,6 | 1,3 | wt |
| IMR32-LV-h-p53 | 2,4 | 2,1 | Knock-down |
| NGP | 4 | 3,1 | wt |
| NGP-LV-m-p53 | 4 | 3,1 | wt |
| NGP-LV-h-p53 | 6 | 3,1 | Knock-down |
| HDMB3 | 1,8 | 1,6 | wt |
| HDMB3 dn p53 | 3,9 | 6 | Dominant negative Form |

Abbildung 12: Die inhibitorische Wirkung von RO3306 auf die Zellviabilität ist abhängig vom p53 Status. Die Zellviabilität wurden für die p53 knock-down Zellen (IMR32-LV-h-p53, NGP-LV-h-p53) und für die p53 dominant negative Form exprimierende Medulloblastomzelllinie (HDMB3 p53 dn) nach 48 h RO3306 bzw. JNJ-7706621 Behandlung bestimmt. Die dazugehörigen IC50-Werte und der p53 Status der Zellen ist in der Tabelle aufgezeigt. Signifikanzen zwischen den parentalen Zelllinien und den p53 knock-down Zellen sind wie folgt dargestellt: **: $p=0,001-0,01$; *: $p=0,01-0,05$.

5.5.4 Einfluss von cdk Inhibitoren auf den Zellzyklus

Um einzugrenzen, wodurch es zu der beobachteten Verringerung der Zellviabilität kommt, wurde eine FACS basierte Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich um einen Phasenarrest handelt und/oder Apoptose ausgelöst wird. Die Zellen wurden sowohl mit dem cdk1- als auch mit dem pan cdk-Inhibitor mit der entsprechenden $IC_{50_{48h}}$ behandelt und nach 24 h bzw. 48 h analysiert.

5.5.4.1 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO-3306, auf den Zellzyklus

Die Zellzyklusanalyse zeigt, dass die Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor zu einem Anstieg der subG1-Phase in allen getesteten Neuroblastomzelllinien (SH-EP, WAC2, NB69, SK-N-FI, NLF) nach 24 h und nach 48 h führt (Abbildung 13 a, b). In der sogenannten subG1-Phase liegt die DNA der Zellen in fragmentierter Form vor, was auf apoptotische Zellen hindeutet. Die NLF Zellen zeigen sowohl nach 24 h als auch nach 48 h den höchsten Anstieg an Zellen in der subG1-Phase. In den p53 mutierten Zelllinien (NLF und SK-N-FI) lässt sich zusätzlich nach 24 h und 48 h ein signifikanter Anstieg der G2-Phase beobachten (Abbildung 13 a, b).

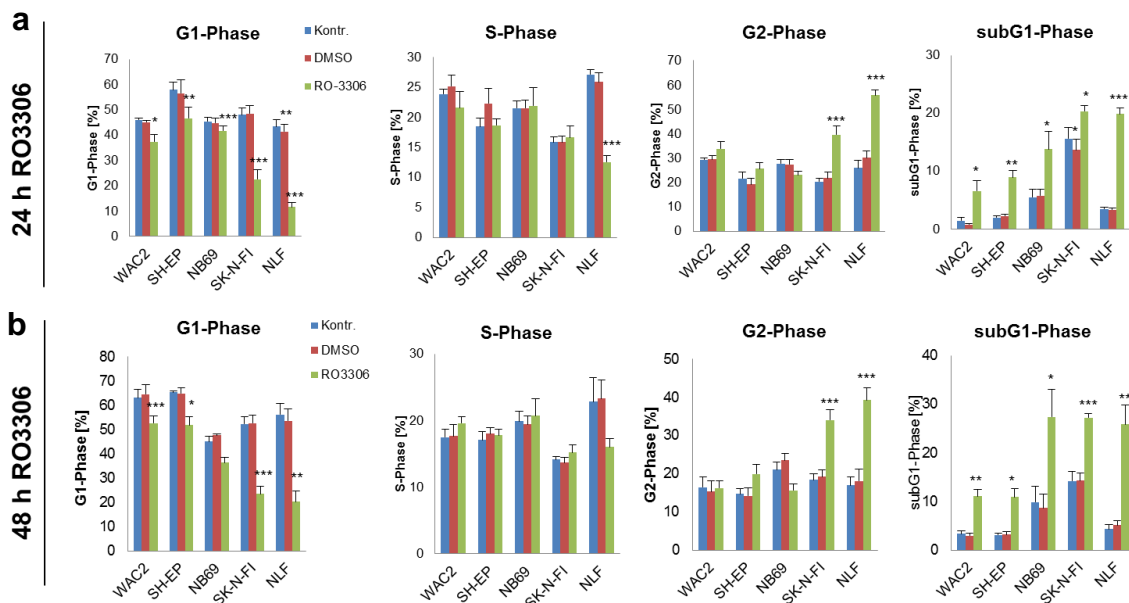


Abbildung 13: Einfluss von RO3306 auf den Zellzyklus. FACS-basierte Zellzyklus Analysen wurden 24 h und 48 h nach Inhibitor Behandlung, mit der entsprechenden $IC_{50_{48h}}$, durchgeführt. Dargestellt sind hier die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und subG1-Phase). Getestet wurden drei p53 wt Zelllinien (WAC2, SH-EP und NB69) und zwei p53 mutierte Zelllinien (SK-N-FI und NLF). Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

5.5.4.2 Einfluss des pan cdk Inhibitors, JNJ-7706621, auf den Zellzyklus

Die Behandlung mit dem pan cdk-Inhibitor führte ebenfalls in allen getesteten Zelllinien, mit Ausnahme der SK-N-FI Zellen, zu einem Anstieg der Zellen in der subG1-Phase (Abbildung 14 a, b). Anders als bei dem cdk1-Inhibitor (RO3306) zeigten sich hier Zelllinien spezifische Zellphasenarreste, die unabhängig vom p53 Status zu sein scheinen. In den NB69- und in den SK-N-FI Zellen kommt es beispielweise sowohl 24 h als auch 48 h nach der Behandlung zu einem Anstieg der S-Phase. Hingegen löst der Inhibitor in den SH-EP Zellen nach 24 h einen Anstieg der Zellen in der G2-Phase aus. Ein Anstieg der Zellen in der G2-Phase konnte nach 24 h ebenfalls in den NB69- und NLF Zellen verzeichnet werden. Nach 48 h kann auch bei den WAC2 Zellen ein Anstieg der G2-Phase beobachtet werden.

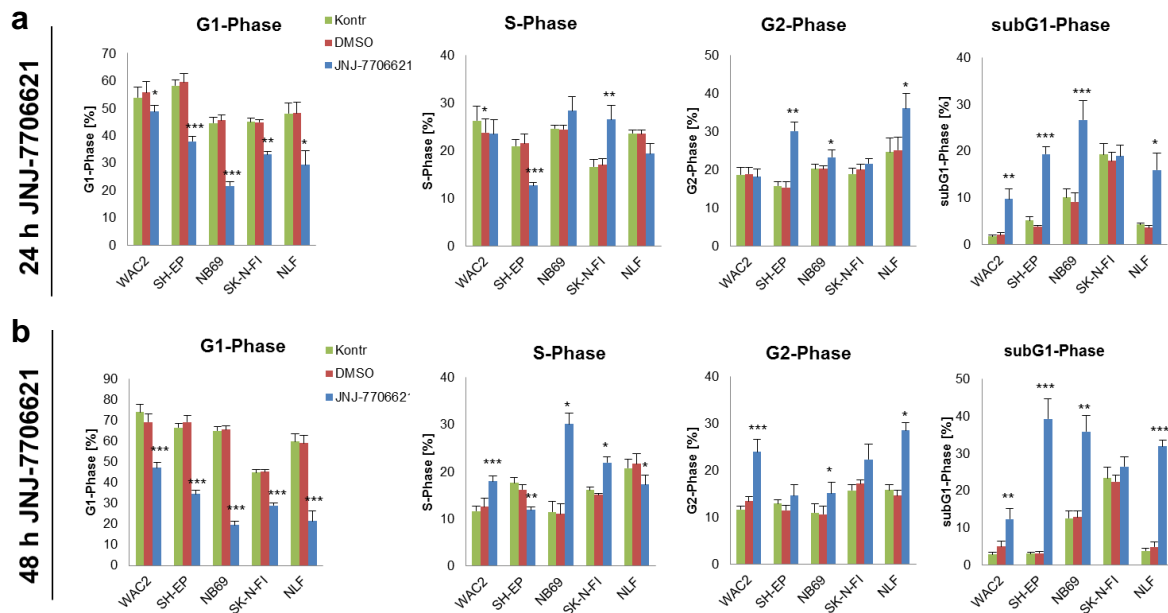


Abbildung 14: Einfluss von JNJ-7706621 auf den Zellzyklus. FACS-basierte Zellzyklus Analysen wurden 24 h und 48 h nach Inhibitorbehandlung mit der entsprechenden IC₅₀_{48h}, durchgeführt. Dargestellt sind hier die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und subG1-Phase). Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: p<0,001; **: p=0,001-0,01; *: p=0,01-0,05.

Ergebnisse

5.5.4.3 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO3306, auf p53 knock-down Zellen

Um den Einfluss des p53-Status auf den Zellzyklus nach cdk1 Inhibition zu validieren, wurden die Zellzyklusuntersuchungen an den p53 knock-down Neuroblastomzellen (IMR-32-LV-h-p53 und NGP-LV-h-p53) sowie an den p53 dominant negativen exprimierenden Medulloblastomzellen (HDMB3 p53 dn) durchgeführt.

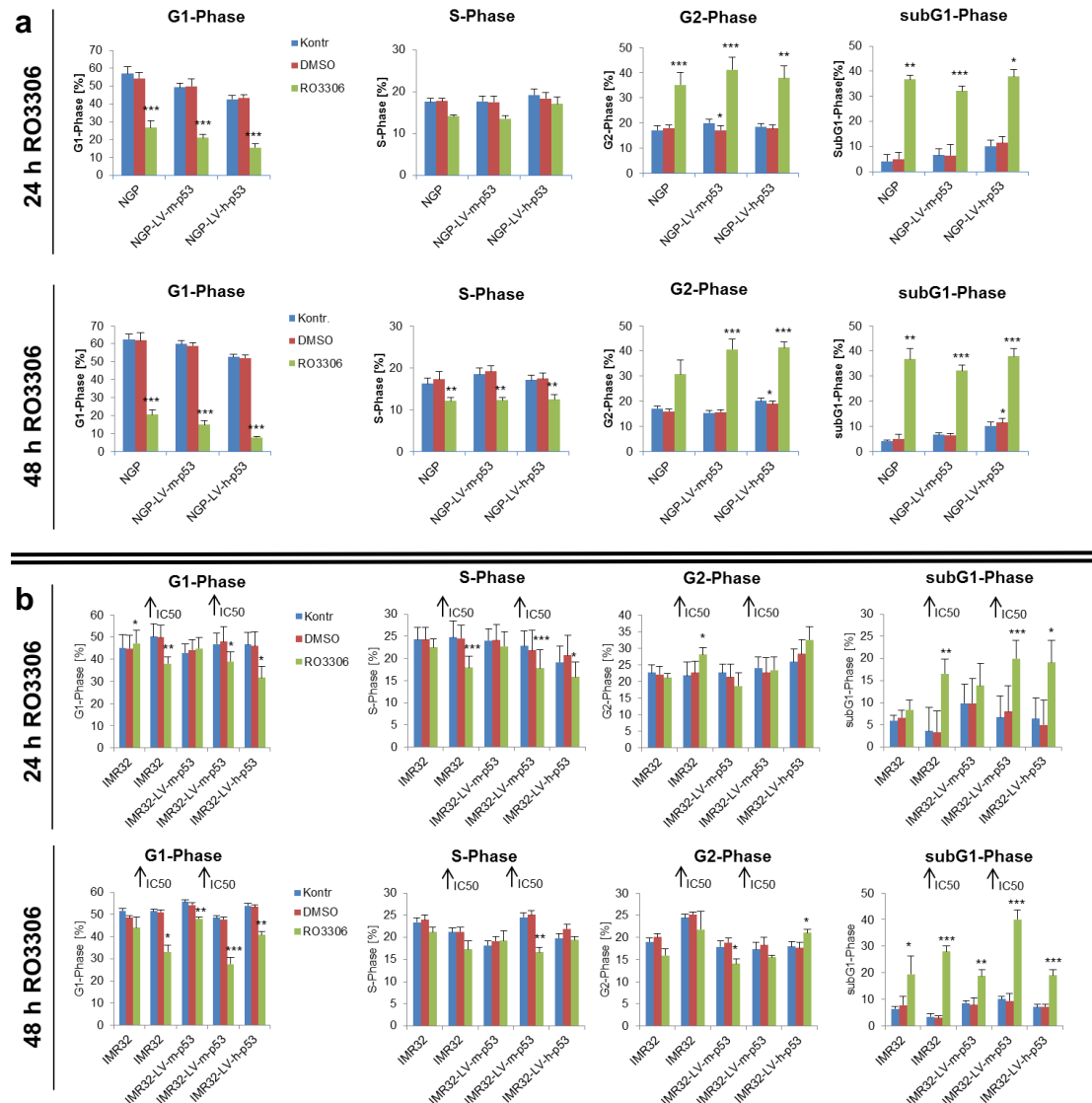


Abbildung 15: RO3306 induziert eine p53 anhängigen G2-Arrest in Neuroblastomzelllinien. Zellzyklusanalysen wurden in p53 knock-down Zellen (IMR32-LV-h-p53, NGP-LV-h-p53) und den dazugehörigen Kontrollen durchgeführt. Die Zellen wurden mit der entsprechenden IC₅₀_{48h} behandelt. ↑ IC₅₀ deutet an, dass diese Zellen mit den IC₅₀-Werten der p53 knock-down behandelt wurden. Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: p<0,001; **: p=0,001-0,01; *: p=0,01-0,05.

Ergebnisse

Sowohl die NGP Kontrollzelllinien als auch die NGP p53 knock-down Zellen zeigten zusätzlich zu dem subG1-Phasen Anstieg eine Zunahme der G2-Phase 24 h und 48 h nach Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor (RO3306). Eingesetzt wurden hier die jeweiligen $IC_{50_{48h}}$ -Werte (Abbildung 16 a). Bei den IMR-32 Zellen wurde eine Zunahme der G2-Phase bei den p53 knock-down Zellen nach 48 h beobachtet (Abbildung 16 b). Auch bei den Medulloblastomzellen zeigte sich eine erhöhte G2-Phase nur in den HDMB3 p53 dn Zellen (Abbildung 16 c). Um einen konzentrationsabhängigen Effekt auszuschließen, wurden die IMR-32 Kontrollzellen und die parentalen HDMB3 mit der jeweiligen IC_{50} -Konzentration der p53 knock-down bzw. p53 dominant negativ exprimierenden Zellen behandelt. Weder bei den IMR-32-LV-m-p53, noch bei den HDMB3 kam es dabei zu einem Anstieg der G2-Phase Zellen. Die Zellen reagierten lediglich mit einer erhöhten subG1-Phase. Ein Anstieg der G2-Phase war jedoch in den parentalen IMR32 nach 24 h zu verzeichnen (Abbildung 16 b, c).

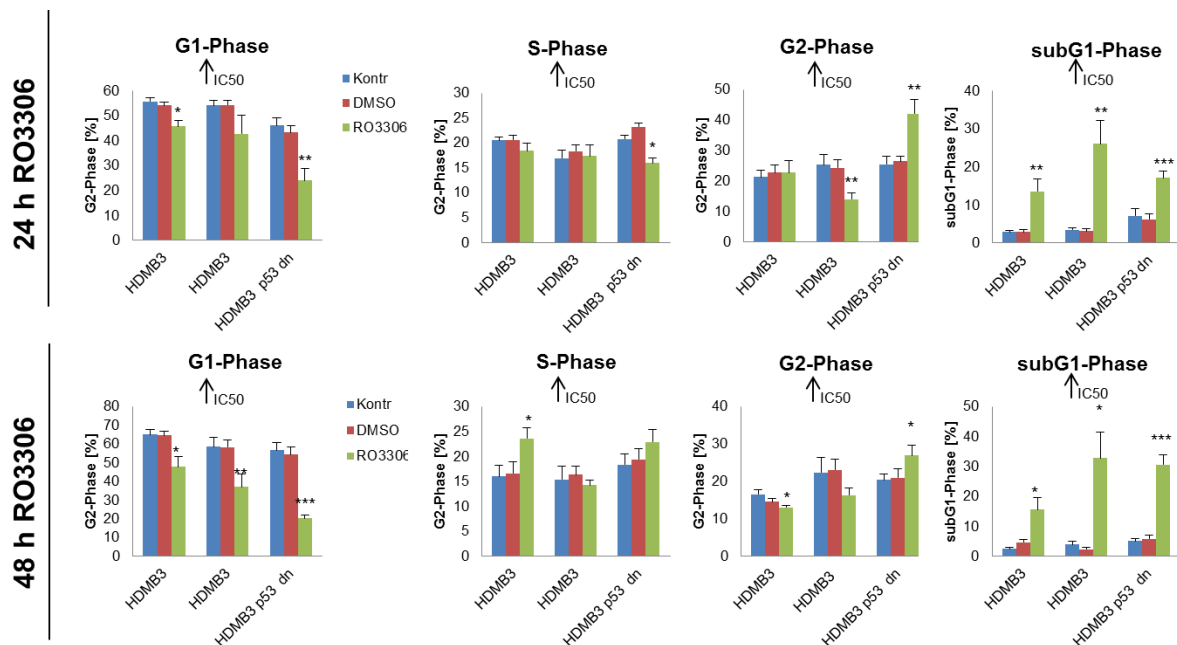


Abbildung 16: RO3306 verursacht einen p53 abhängigen G2-Arrest in Medulloblastomzellen. Zellzyklusanalysen wurden in p53 dominant negativ exprimierenden Medulloblastomzellen (HDMB3 p53 dn) und den dazugehörigen Kontrollen durchgeführt. Die Zellen wurden mit der entsprechenden $IC_{50_{48h}}$ behandelt. $\uparrow IC_{50}$ deutet an, dass diese Zellen mit den IC_{50} -Werten der HDMB3 p53 dn Zellen behandelt wurden. Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$

5.5.5 Nachweis von Apoptose durch die Inhibition von cdk1 durch RO3306

Die durch den Anstieg an subG1-Phase Zellen suggerierte Apoptose sollte durch einen ELISA-basierten Assay (4.10) bestätigt werden. Im hierfür verwendete Cell Death ELISA (Roche) konnte gezeigt werden, dass es 48 h nach cdk1 Inhibition in allen Neuroblastomzelllinien zu einem Anstieg von apoptotischen Zellen kommt. Der Anteil an apoptotischen Zellen war mit einem 5-fachen Anstieg in den WAC2 Zellen am höchsten und in den SK-N-FI Zellen mit einer Verdopplung der apoptotischen Zellen am geringsten. Ein p53-abhängiger Effekt auf die Apoptose ließ sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten (Abbildung 17).

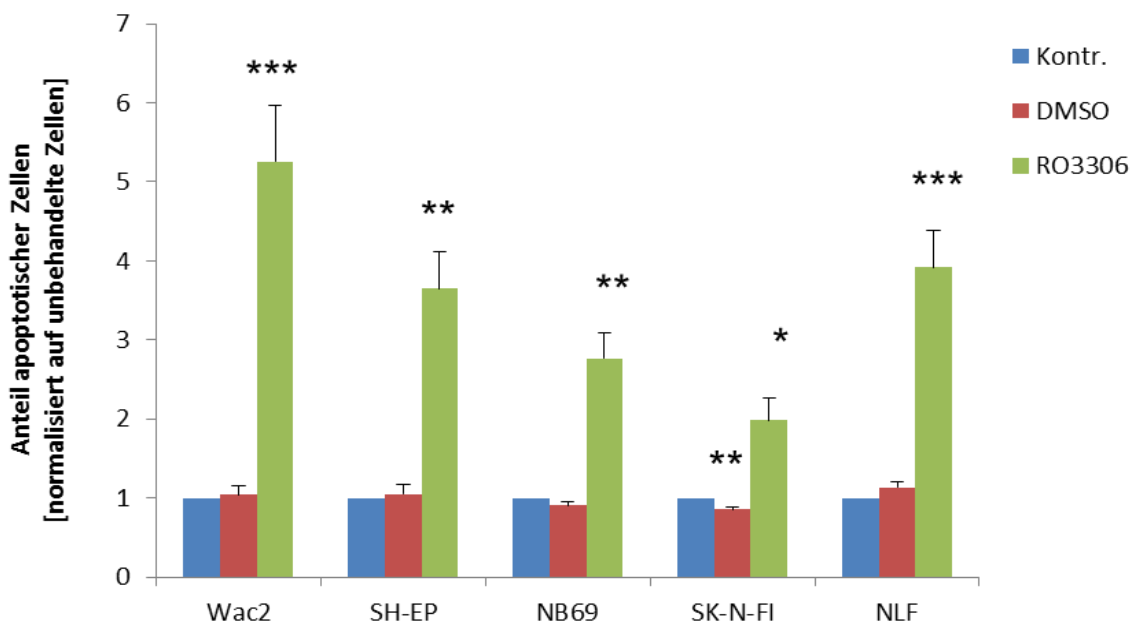


Abbildung 17: Die Inhibition von cdk1 leitet in NB Zellen Apoptose ein. Die Apoptose wurde in den Zellen 48 h nach Behandlung mit dem cdk1 Inhibitor (RO3306), für unbehandelte Zellen (Kontr.) und für DMSO behandelte Zellen (DMSO) mittels Apoptose Assays ermittelt. Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

5.5.6 Einfluss des cdk1-Inhibitors, RO3306, auf die mitochondriale Aktivität

Als Surrogatparameter für mitochondriale Apoptose wurde die mitochondriale Aktivität 24 h nach RO3306 Behandlung untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem Mitotracker-Farbstoff Deep Red (Invitrogen) gefärbt und die Fluoreszenz am FACS vermessen (4.10). Dabei zeigten sich Unterschiede insofern, als dass in den WAC2-, SH-EP- und NLF Zellen die Anzahl der aktiven Mitochondrien deutlich abnimmt. Außerdem gibt es bei den SH-EP

Ergebnisse

Zellen eine messbare Population an Zellen, die eine verringerte Mitochondrienaktivität aufweist. In den NB69- und in den SK-N-FI Zellen ist keine sichtbare Veränderung wahrzunehmen. Jedoch lässt sich bei diesen beiden Zelllinien schon in den Kontrollen ein diffuseres Aktivitätsmuster beobachten (Abbildung 18).

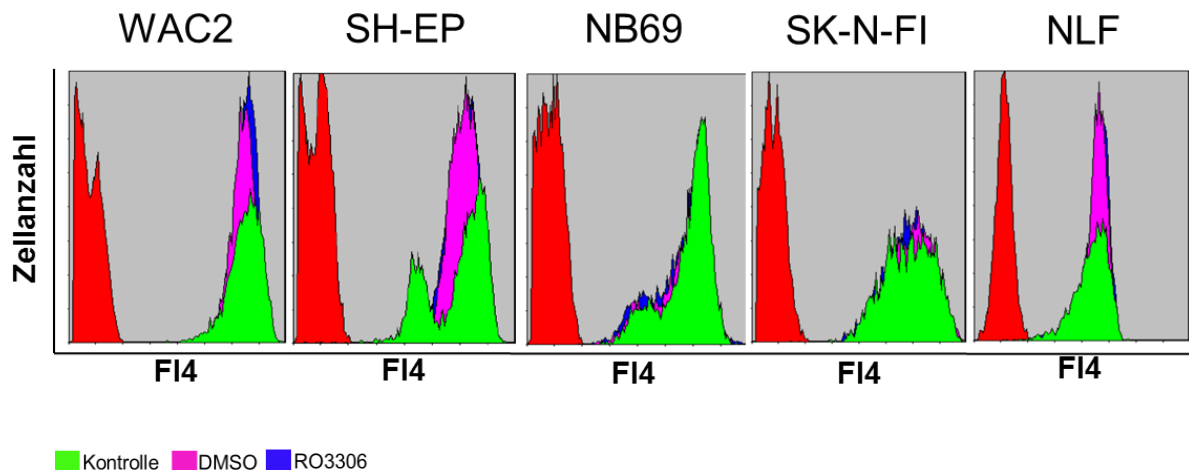


Abbildung 18: Einfluss der cdk1 Inhibition auf die mitochondriale Aktivität. Die mitochondriale Aktivität wurde mit Hilfe des Mitotracker-Farbstoffs Deep Red (Invitrogen) am FACS bestimmt. Untersucht wurden unbehandelte Zellen (grün), DMSO behandelte Zellen (pink) und für 24 h RO3306 ($IC_{50_{48h}}$) behandelte Zellen (blau).

5.5.7 Rollen von Caspasen in der von R03306 vermittelten Apoptose

Die an der Apoptose beteiligten Effektor-Caspasen sollten im nächsten Abschnitt weiter analysiert werden. Dazu wurde die Caspase mRNA-Expression überprüft sowie die Aktivität der Caspase-8 und -9 im Caspase Glo-Assay untersucht. Um die Notwendigkeit der Caspasen für die cdk-Inhibitor-vermittelte Apoptose nachzuweisen, wurde ein pan Caspase-Inhibitor, Q-VD-OPh, nicht O methyliert (Calbiochem), eingesetzt.

5.5.7.1 Überprüfung der Caspase mRNA-Level

Um zu untersuchen ob die Caspase-3, -8, -9 auf transkriptioneller Ebene durch den cdk1 - Inhibitor reguliert werden, wurden semiquantitative PCRs durchgeführt und ausgewertet. Die Caspase-3, -8 und -9 mRNA konnten in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildeten die SK-N-FI Zellen, in den keine Caspase-8 mRNA nachgewiesen werden konnte. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten konnten nicht festgestellt werden. Insgesamt sieht es jedoch so aus, als wenn nach 4 h die Caspase-

Level abnehmen und nach 24 h wieder auf das Ausgangslevel zurück gelangen (Abbildung 19).

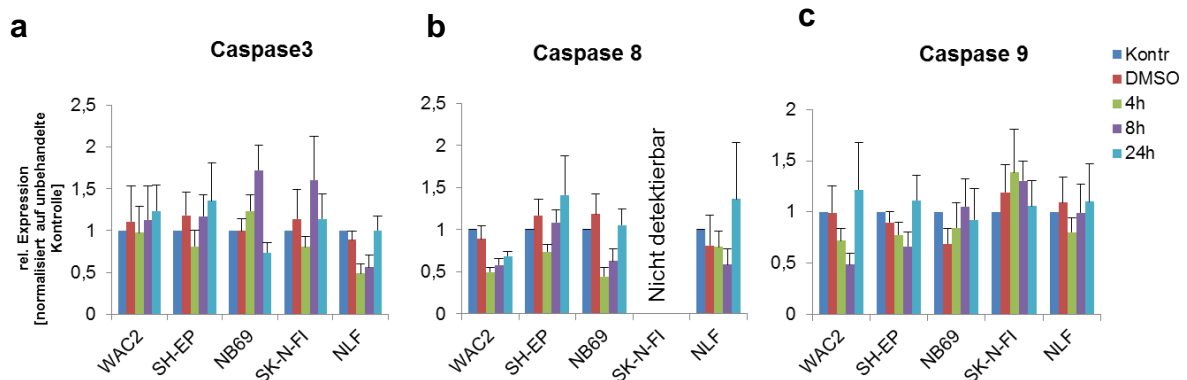


Abbildung 19: Caspase-3,-8,-9 mRNA Expression nach RO3306 Behandlung. In der semiquantitativen Auswertung wurden die Expressionslevel für unbehandelte Zellen (Kontr.) auf den Wert 1 gesetzt und DMSO behandelte Zellen sowie Zellen nach 4 h, 8 h und 24 h RO3306 ($IC_{50_{48h}}$) Behandlung dazu in Bezug gesetzt.

5.5.7.2 Nachweis der Caspase-8 und -9 Aktivierung durch die Inhibition von cdk1

Die Caspase-Aktivität wurde mit Hilfe des Caspase-8 bzw. Caspase-9 Glo-Assay (Promega) untersucht (4.11). Die Aktivität wurde nach 24 h und 48 h bestimmt. Bei allen getesteten Zelllinien sieht man, dass sowohl Caspase-8 als auch -9 nach 24 h bzw. 48 h RO3306 Behandlung aktiv sind. Zwischen den beiden Zeitpunkten sind keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen. Auch zwischen den beiden Caspasen gab es innerhalb einer Zelllinie nur geringe Unterschiede in der Aktivität. So liegt beispielsweise die Aktivität der Caspase-8 bzw. Caspase-9 in den SH-EP Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung ca. 1,5-fach so hoch wie in den Kontrollen. Die stärkste Aktivität konnte in den p53 mutierten Zelllinien SK-N-FI und NLF festgestellt werden. Hier lagen die Aktivitätslevel um das 2- bis 3-fache höher, wohingegen bei den p53 wt Zellen die Werte zwischen 1,4 und 2 lagen (Abbildung 20).

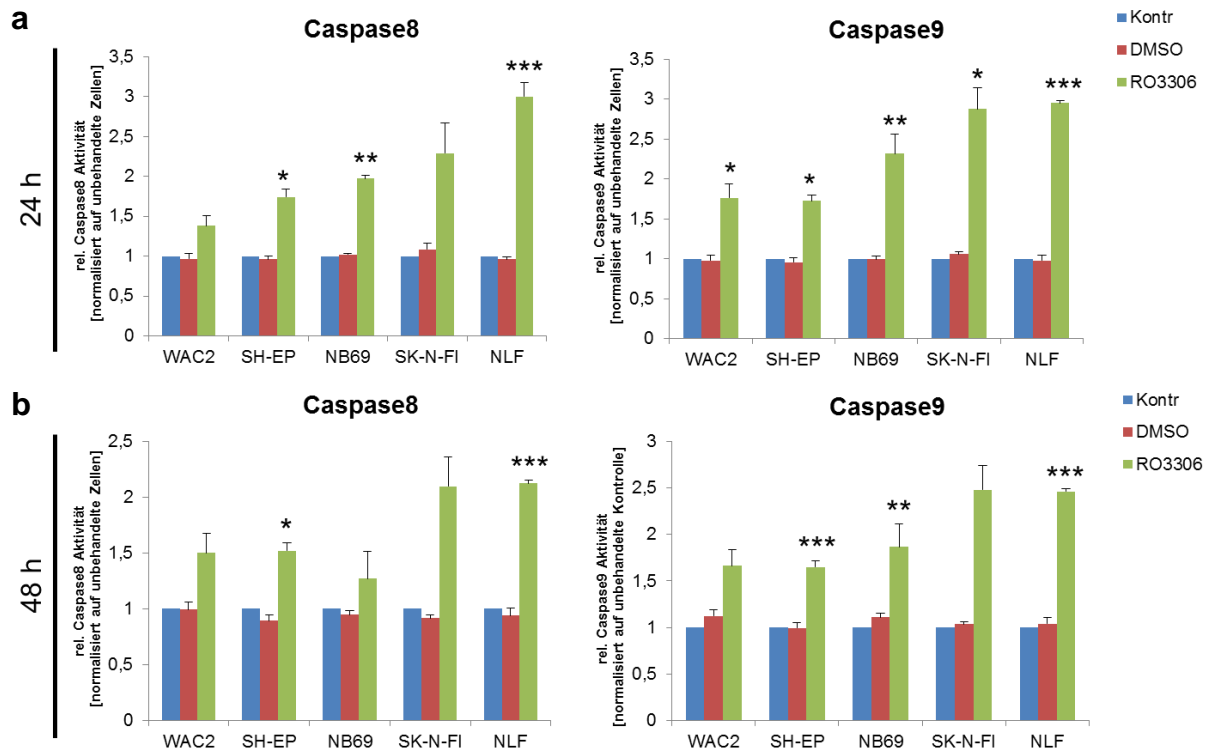


Abbildung 20: Caspase-8 und -9 Aktivitätslevel nach cdk1 Inhibition. Die Graphen zeigen die durch einen Caspase Glo-Assay (Promega) gemessenen relativen Aktivitätslevel der Caspase-8 und -9 nach 24 h und 48 h cdk1 Inhibition durch RO3306. Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

5.5.7.3 Beteiligung von Caspasen an der RO3306 vermittelten Apoptose

Um nachzuweisen, dass die Behandlung mit RO3306 Caspase-vermittelte Apoptose auslöst, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem cdk1- Inhibitor und mit einem pan Caspase-Inhibitor (Q-VD-OPh, nicht O methyliert) behandelt (4.12). Es wurden dann sowohl ein photometrischer Assay als auch eine FACS-basierte Zellzyklusanalyse zum Nachweis der Apoptose durchgeführt.

Nachweise der Apoptose nach RO3306 Behandlung und Inhibition der Caspase Aktivität

Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des Cell Death ELISA (Roche) analysiert (4.9). Die durch die cdk1 Inhibition ausgelöste Apoptose konnte durch die Zugabe des pan Caspase-Inhibitors blockiert werden. Nach Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor erkennt man deutlich einen Anstieg der Apoptoselevel bis auf das 4,5-fache. Nach der simultanen Behandlung mit dem cdk1 und dem pan Caspase-Inhibitor (RO3306 und Q-VD-OPh, nicht O methyliert)

Ergebnisse

konnte die Anzahl an apoptotischen Zellen bei allen Zelllinien bis auf SK-N-FI signifikant verringert werden. Nach Inhibition der Caspaseaktivität lagen die Apoptoselevel wieder im Bereich der unbehandelten Zellen (Abbildung 21).

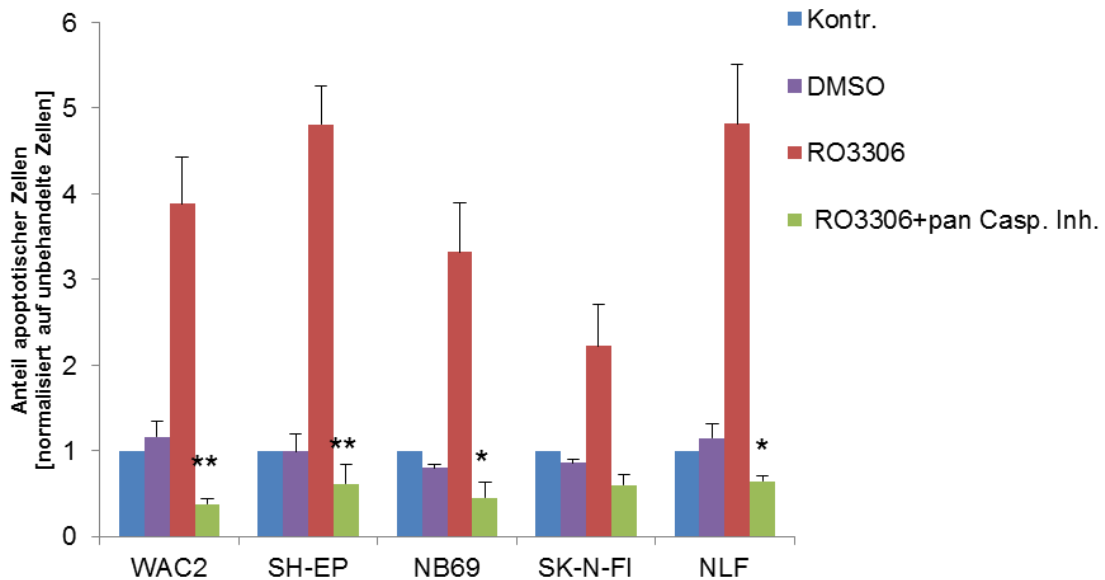


Abbildung 21: Die durch RO3306 induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig. Die Apoptose wurde nach 48-stündiger Behandlung mit RO3306 und der simultanen Behandlung von RO3306 und dem pan Caspase-Inhibitor, bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptose wurde ein photometrisch basierter Assay verwendet. Signifikanzen zwischen den RO3306 behandelten und den RO3306+pan Caspase Inhibitor behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: **: $p=0,001-0,01$; *: $p=0,01-0,05$.

Untersuchung des Zellzyklus nach RO3306 Behandlung und Inhibition der Caspase-Aktivität

Um eine weitere Bestätigung zu erhalten, dass die durch den cdk1-Inhibitor ausgelöste Apoptose Caspase-abhängig ist und um zu sehen, welchen Effekt der cdk1-Inhibitor auf den Zellzyklus hat, wenn die Apoptose unterdrückt wird, wurde eine Zellzyklusuntersuchung durchgeführt. Die Zellzyklusanalyse bestätigt das Ergebnis des Cell Death ELISAs. Der Anteil der subG1-Phasen konnte bei allen Zellen nach der Behandlung mit dem cdk1- und dem pan Caspase-Inhibitor signifikant reduziert werden. Bei den beiden p53 mutierten Zelllinien blieb der Anteil an Zellen in der subG1-Phase allerdings höher als in den Kontrollzellen. Hier konnte lediglich eine Reduzierung der subG1-Phase von ca. 7 % in den SK-N-FI Zellen und um 3 % in den NLF Zellen beobachtet werden. In den SH-EP-, WAC2- und NB69 Zellen konnte ein Wiederanstieg der G1- Phase durch den pan Caspase-Inhibitor

Ergebnisse

wahrgenommen werden. Auch in den SK-N-FI Zellen kam es zu einem signifikanten Anstieg der G1-Phase. Auffallend ist auch, dass die Unterdrückung der Apoptose durch den pan Caspase-Inhibitor zu einem Anstieg der G2-Phase in den NB69 Zellen führt (Abbildung 22).

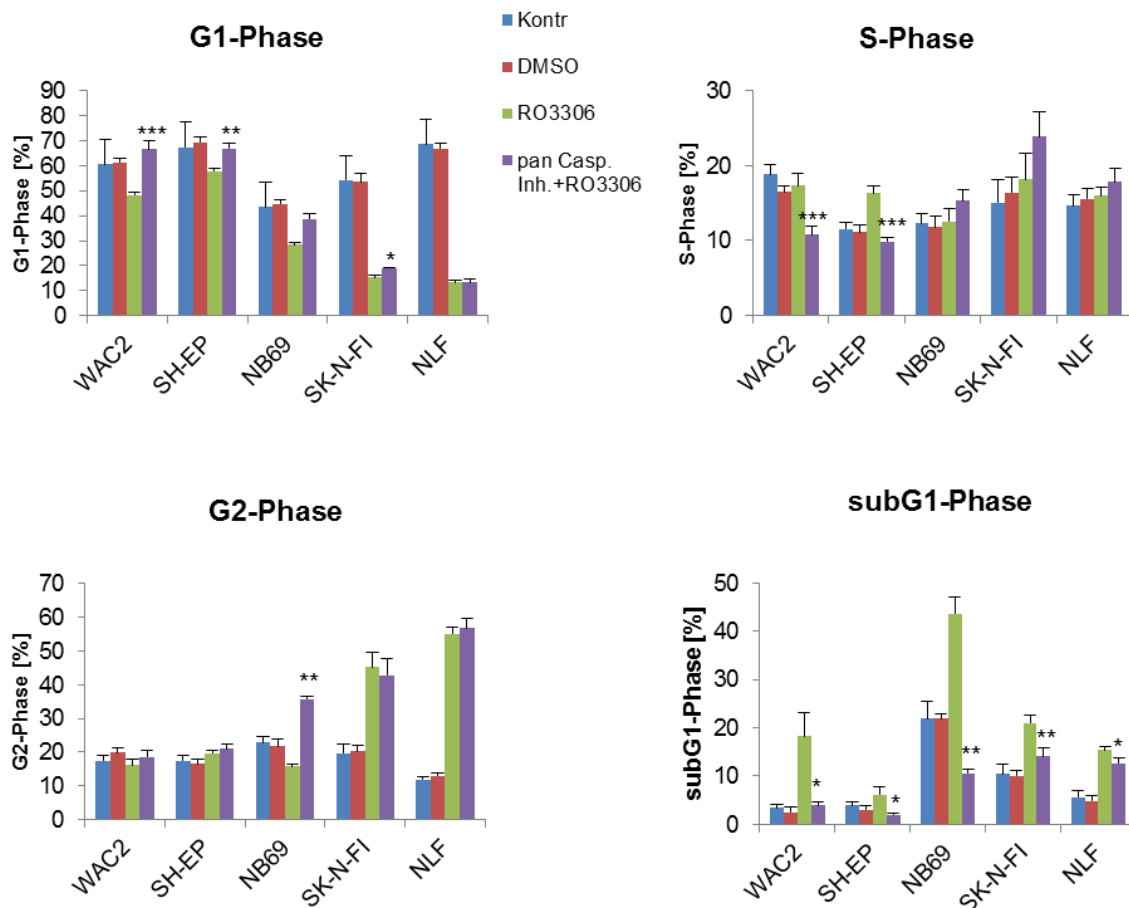


Abbildung 22: Inhibition der Caspase-Aktivität verhindert die durch RO3306 induzierte Apoptose. Ergebnisse der Zellzyklusanalyse nach der Behandlung von RO3306 mit und ohne Blockierung der Caspase-Aktivität. Gemessen wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen 48 h nach Behandlung. Signifikanzen zwischen den RO3306 behandelten und den RO3306+pan Caspase-Inhibitor behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

5.5.8 Nachweis der Aktivierung des p53 Signalweges nach Inhibition von cdk1

Da die Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor einen p53-abhängigen Effekt auf die Inhibitor Effizienz und den Zellzyklus auslöste, wurde der p53 Signalweg weiter untersucht.

Dazu wurden die mRNA- und Proteinexpression von p53-Zielgenen in drei p53 wt Zelllinien (SH-EP, WAC2, NB69) und zwei p53 mutierten Zelllinien (SK-N-FI, NLF), die mit der jeweiligen IC₅₀_{48h} von RO3306 für 4 h, 8 h und 24 h behandelt wurden, untersucht.

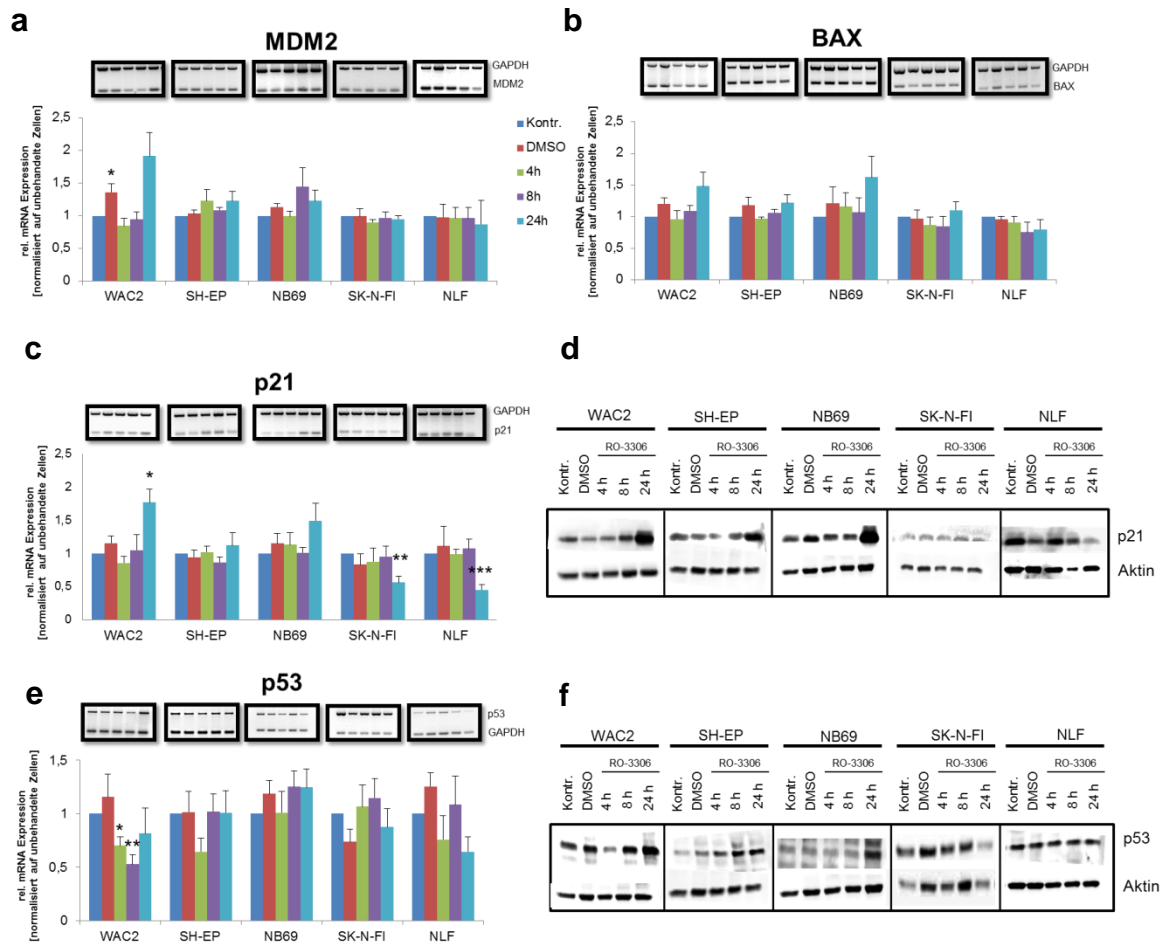


Abbildung 23: RO-3306 aktiviert den p53 Signalweg. Die Aktivierung des p53 Signalweges in den p53 wt Zellen (WAC2, SH-EP, NB69) konnte durch die Erhöhung der p53 downstream Targets BAX, MDM2 und p21 auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR nachgewiesen werden. Die p21 und p53 Expression wurden auch per Western Blot für unbehandelte Zellen (Kontr.), DMSO behandelte Zellen und für Zellen nach 4 h, 8 h und 24 h RO3306 Behandlung bestimmt. Signifikanzen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen sind wie folgt dargestellt: ***: $p < 0,001$; **: $p = 0,001-0,01$; *: $p = 0,01-0,05$.

Es konnte gezeigt werden, dass es auf mRNA-Ebene in den p53 wt Zellen zu einem Anstieg der p53 downstream Targets, BAX, MDM2 und p21 kommt (Abbildung 23 a, b, c). Der Anstieg von p21 nach 24 h konnte auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 23 d). Hingegen konnte für die p21 Expression eine signifikante Abnahme der mRNA-Level in den p53 mutierten Zellen beobachtet werden. Auf mRNA-Ebene zeigte sich weiterhin, dass p53 in SH-EP und WAC2 Zellen zunächst abnahm und dann wieder auf Ausgangslevel anstieg. In den NB69 Zellen konnte ein leichter Anstieg der p53 mRNA-Level nach 8 h und 24 h beobachtet werden (Abbildung 23 e). Auf Proteinebene ließ sich jedoch ein erhöhtes p53-Level in allen p53 wt Zellen nach 24-stündiger cdk1 Inhibition nachweisen. Die p53 Proteinexpression blieb in den p53 mutierten Zellen unverändert (Abbildung 23 f).

5.6 Duale Inhibition von cdk1 und ALK

Auf Grund eines Kongressbeitrages (ANR 2014, Köln) von A. Wood gibt es Grund zur Annahme, dass die Kombination aus cdk4/6- und ALK-Inhibition einen synergistischen Effekt auf die Zellviabilität hervorruft. Daher wurde in dieser Arbeit die Kombination aus cdk-Inhibitoren (RO3306 und JNJ-7706621) und ALK-Inhibitoren (Crizotinib und TAE684) untersucht (4.13). Getestet wurden zum einen die simultane Behandlung und zum anderen sukzessive Behandlungsansätze. Das ausgewählte Zellpanel enthielt eine Zelllinie mit einer ALK Mutation F_{1174L} (SY5Y) (George et al. 2008), eine Zelllinie, in dem ein Teil des ALK Genes amplifiziert vorliegt (IMR32) (Cazes et al. 2013), einer Zelllinie mit einer p53 Mutation (SK-N-FI) und einer Zelllinie, die Wildtyp für p53 und ALK ist (NB69).

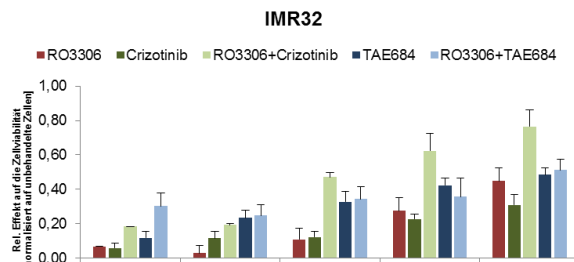
5.6.1 Simultane Kombinationstherapie

Für die duale Kombinationstherapie wurden die cdk-Inhibitoren (RO3306 und JNJ-7706621) und die ALK-Inhibitoren (Crizotinib und TAE684) gleichzeitig für 48 h auf die Zellen gegeben. Der Effekt auf die Zellviabilität wurde in MTT-Assays ermittelt und die Kombinationsindices (CI) mit Hilfe des Programmes CompuSyn berechnet (4.13).

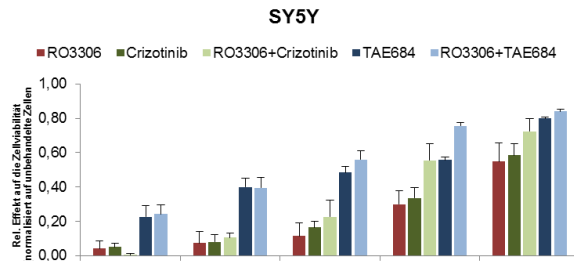
5.6.1.1 Simultane Behandlung von Neuroblastomzellen mit RO3306 und ALK-Inhibitoren

In den IMR32 Zellen wirkte die simultane Inhibition von cdk1 und ALK durch RO3306 und Crizotinib bei allen getesteten Konzentrationen synergistisch. Bei den SY5Y- und den NB69 Zellen zeigte sich ein synergistischer Effekt dieser Inhibitor Kombination nur bei Einsatz höherer Dosen. Bei sehr niedrigen Konzentrationen wirkte die simultane Zugabe von RO3306 und Crizotinib antagonistisch auf die Zellviabilität.

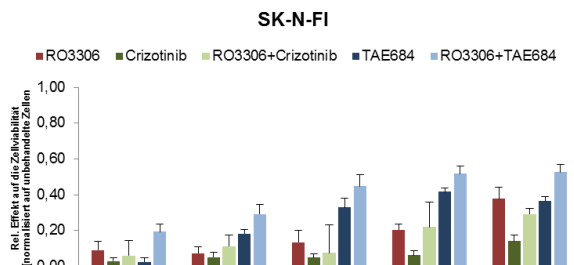
Ergebnisse



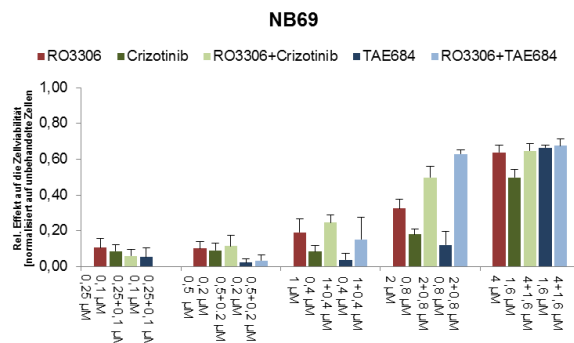
| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------|----------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 0,34 | synergistisch | 0,33 | synergistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 0,64 | synergistisch | 0,96 | nahezu additiv |
| 1 µM+0,4 µM | 0,28 | stark synergistisch | 1,05 | nahezu additiv |
| 2 µM+0,8 µM | 0,29 | stark synergistisch | 1,94 | antagonistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 0,28 | stark synergistisch | 1,73 | antagonistisch |



| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|----------------------|---------------|---------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 10,01 | stark antagonistisch | 1,09 | nahezu additiv |
| 0,5 µM+0,2 µM | 1,58 | antagonistisch | 0,97 | nahezu additiv |
| 1 µM+0,4 µM | 1,47 | antagonistisch | 0,92 | nahezu additiv |
| 2 µM+0,8 µM | 0,85 | leicht synergistisch | 0,27 | stark synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 0,90 | leicht synergistisch | 0,76 | mäßig synergistisch |



| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 1,38 | mäßig antagonistisch | 0,43 | synergistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 0,95 | Nahezu additiv | 0,47 | synergistisch |
| 1 µM+0,4 µM | 3,80 | Stark antagonistisch | 0,46 | synergistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 1,14 | leicht antagonistisch | 0,28 | stark synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 1,32 | Mäßig antagonistisch | 1,32 | mäßig antagonistisch |



| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 2,21 | antagonistisch | 5,77 | stark antagonistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 1,95 | antagonistisch | 2,41 | antagonistisch |
| 1 µM+0,4 µM | 1,41 | mäßig antagonistisch | 0,23 | Stark synergistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 0,84 | Mäßig synergistisch | 0,97 | Nahezu additiv |
| 4 µM+1,6 µM | 0,87 | Mäßig synergistisch | 5,77 | Stark antagonistisch |

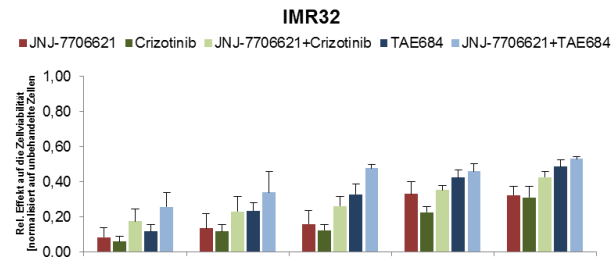
Abbildung 24: Effekte der simultanen Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor, RO3306, und den ALK-Inhibitoren, Crizotinib und TAE684, auf die Zellviabilität. Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SK-N-FI, NB69) wurden für 48 h gleichzeitig mit dem cdk1-Inhibitor (RO330) und einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitorkombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

Bei der p53 mutierten Zelllinie SK-N-FI allerdings wirkte die Kombination aus RO3306 und Crizotinib bei keiner der getesteten Kombinationen synergistisch. Bei der simultanen Zugabe von RO3306 und TAE684 konnten in den IMR32 Zellen und in den SK-N-FI Zellen in den niedrigen Konzentrationsbereichen synergistische Effekte vermerkt werden. Bei den SK-N-FI Zellen wirkte nur die Kombination aus 4 μ M RO3306 und 1,6 μ M TAE684 mäßig antagonistisch. Bei der ALK mutierten Zelllinie SY5Y führte die Behandlung von RO3306 und TAE684 (2 μ M+0,8 μ M und 4 μ M+1,6 μ M) zu synergistischen Effekten auf die Zellviabilität. In den NB69 Zellen zeigte nur die Behandlung mit 1 μ M RO3306 und 0,4 μ M TAE684 einen synergistischen Effekt (Abbildung 24).

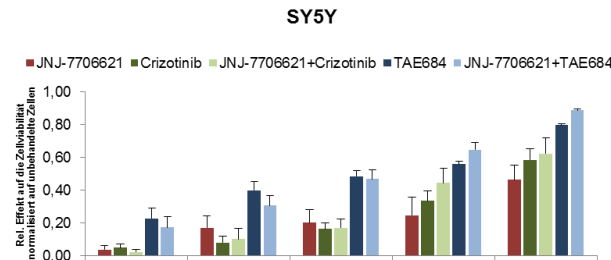
5.6.1.2 Simultane Behandlung von Neuroblastomzellen mit JNJ-7706621 und ALK-Inhibitoren

In einem weiteren Versuch wurde die Kombination aus dem pan cdk-Inhibitor JNJ-7706621 und den ALK-Inhibitoren, Crizotinib bzw. TAE684, getestet. Die Kombination aus JNJ-7706621 und Crizotinib hatte einen synergistischen Effekt auf die p53 mutierte Zelllinie SK-N-FI. Weitere synergistische Effekte zeigten sich bei der Kombination aus JNJ-7706621 und Crizotinib nur noch bei Einsatz niedriger Konzentrationen in den IMR32 Zellen, in dem ein Teil des ALK-Genes amplifiziert vorliegt. In den anderen Zellen wurden bei dieser Kombination von Inhibitoren sonst nur additive oder antagonistische Effekte nachgewiesen. Bei der gleichzeitigen Behandlung mit JNJ-7706621 und TAE684 konnten für die IMR32 Zellen bei dem Einsatz niedriger Konzentrationen synergistische Effekte gezeigt werden. Bei den SY5Y- und NB69 Zellen war dieser Effekt nur bei der Behandlung mit den höchsten Konzentrationen (4 μ M+1,6 μ M) zu beobachten (Abbildung 25).

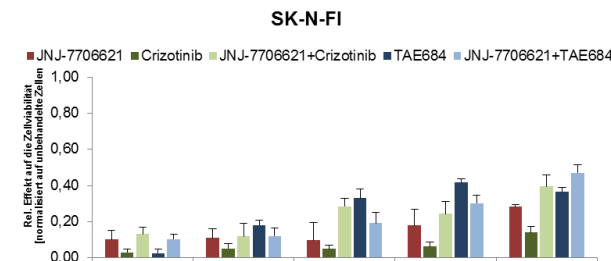
Ergebnisse



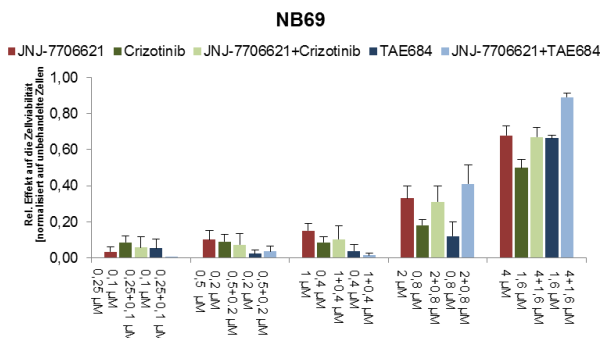
| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 0,47 | synergistisch | 0,47 | synergistisch |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 0,55 | synergistisch | 0,52 | synergistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 0,87 | leicht synergistisch | 0,18 | stark synergistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 0,90 | nahezu additiv | 1,00 | nahezu additiv |
| 4 μ M+1,6 μ M | 1,13 | leicht antagonistisch | 1,31 | mäßig antagonistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|--------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 4,08 | stark antagonistisch | 1,83 | antagonistisch |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 11,07 | Sehr stark antagonistisch | 1,54 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 4,68 | Stark antagonistisch | 1,38 | Mäßig antagonistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 1,42 | Mäßig antagonistisch | 1,17 | Leicht antagonistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 1,44 | Mäßig antagonistisch | 0,43 | synergistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 0,34 | synergistisch | 1,09 | Nahezu additiv |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 0,90 | Leicht synergistisch | 1,67 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 0,17 | Stark synergistisch | 1,51 | antagonistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 0,54 | synergistisch | 1,47 | antagonistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 0,23 | stark synergistisch | 1,36 | Mäßig antagonistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 1,59 | antagonistisch | 31,92 | stark antagonistisch |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 2,51 | antagonistisch | 2,94 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 3,43 | Stark antagonistisch | 12,63 | Stark synergistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 1,88 | antagonistisch | 1,38 | Mäßig antagonistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 1,06 | Nahezu additiv | 0,46 | synergistisch |

Abbildung 25: Effekte der simultanen Behandlung mit dem cdk1-Inhibitor, JNJ-7706621, und den ALK-Inhibitoren, Crizotinib und TAE684, auf die Zellviabilität. Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SK-N-FI, NB69) wurden für 48 h gleichzeitig mit dem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) und einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitor kombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

5.6.2 Sukzessive Kombinationstherapie mit ALK- und cdk-Inhibitoren

Ein weiterer Therapieansatz ist die sukzessive Behandlung mit den Inhibitoren. Hier wurden zwei Ansätze ausgetestet. Zum einen wurde zuerst 24 h mit den cdk-Inhibitoren behandelt und danach die ALK-Inhibitoren für 48 h zugegeben und zum anderen wurde vorab 24 h mit den ALK-Inhibitoren und danach für weitere 48 h mit den cdk-Inhibitoren behandelt.

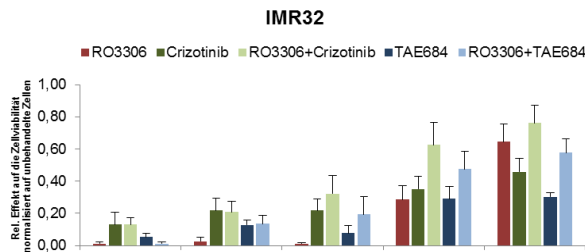
5.6.2.1 cdk Inhibition mit anschließender ALK-Inhibition

Im nächsten Kapitel sind die Ergebnisse der 24-stündigen cdk Inhibition mit anschließender ALK Inhibition beschrieben.

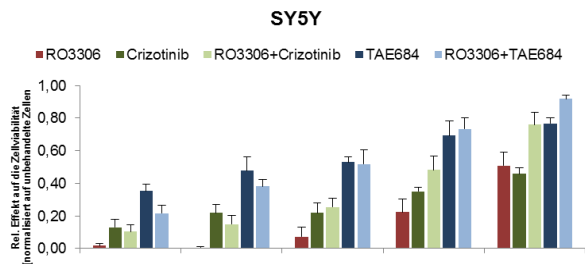
RO3306 Behandlung mit anschließender ALK Inhibition

Die 24-stündige Vorbehandlung mit dem cdk1-Inhibitor, RO3306 (4 μ M), und der anschließenden 48-stündigen Folgebehandlung des ALK-Inhibitors, Crizotinib (1,6 μ M), führte in den IMR32-, SY5Y- und NB69 Zellen zu einem synergistischen Effekt in Bezug auf die Verminderung der Zellviabilität. Bei der p53 mutierten Zelllinie SK-N-FI führte die sukzessive Behandlung mit RO3306 und Crizotinib, wie schon bei der simultanen Behandlung, bei allen getesteten Konzentrationskombinationen zu additiven bzw. antagonistischen Effekten auf die Zellviabilität. Die Behandlung von RO3306 mit der Folgebehandlung von TAE684 rief bei hohen Konzentrationen der Inhibitoren in allen getesteten Zelllinien synergistische Effekte hervor. Die Behandlungen mit niedrigen Konzentrationen führten sowohl bei der Kombination aus RO3306 mit Crizotinib als auch mit TAE684 zu antagonistischen bis additiven Ergebnissen.

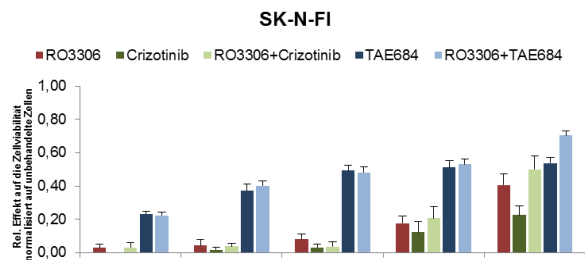
Ergebnisse



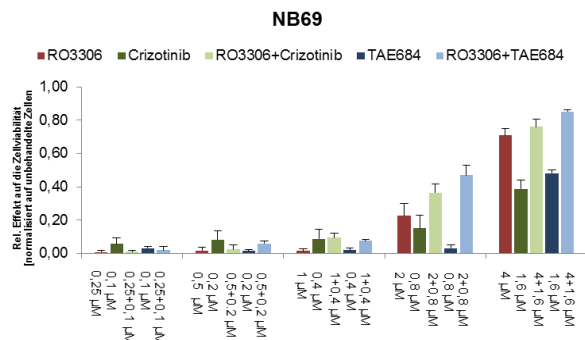
| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 1,22 | Mäßig antagonistisch | 8,91 | Stark antagonistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 1,07 | Nahezu additiv | 0,87 | Leicht synergistisch |
| 1 µM+0,4 µM | 0,97 | Nahezu additiv | 1,13 | Leicht antagonistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 0,52 | synergistisch | 0,29 | stark synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 0,62 | synergistisch | 1,06 | Nahezu additiv |



| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------|----------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 0,88 | Leicht synergistisch | 2,88 | antagonistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 1,15 | Leicht antagonistisch | 1,77 | antagonistisch |
| 1 µM+0,4 µM | 1,21 | Mäßig antagonistisch | 1,61 | antagonistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 0,97 | Nahezu additiv | 0,36 | synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 0,70 | Mäßig synergistisch | 0,36 | synergistisch |



| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|----------------|---------------|---------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 0,91 | Nahezu additiv | 1,87 | antagonistisch |
| 0,5 µM+0,2 µM | 1,53 | antagonistisch | 0,70 | Mäßig synergistisch |
| 1 µM+0,4 µM | 3,25 | antagonistisch | 0,76 | mäßig synergistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 1,85 | antagonistisch | 0,42 | synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 2,09 | antagonistisch | 0,60 | synergistisch |



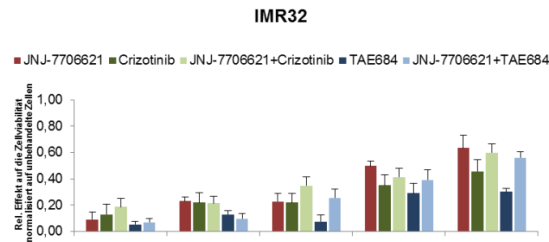
| | RO3306+Crizotinib | | RO3306+TAE684 | |
|----------------|-------------------|----------------------|---------------|---------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 µM+0,1 µM | 9,42 | Stark antagonistisch | 1,02 | Nahezu additiv |
| 0,5 µM+0,2 µM | 5,40 | Stark antagonistisch | 0,92 | Nahezu additiv |
| 1 µM+0,4 µM | 2,30 | antagonistisch | 1,54 | antagonistisch |
| 2 µM+0,8 µM | 1,04 | Nahezu additiv | 0,28 | Stark synergistisch |
| 4 µM+1,6 µM | 0,68 | Mäßig synergistisch | 0,50 | synergistisch |

Abbildung 26: Effekte des sukzessiven Behandlungsansatzes unter Einsatz des cdk1-Inhibitors, RO3306, mit anschließender ALK Inhibition auf die Zellviabilität. Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SK-N-FI, NB69) wurden nacheinander für 24 h mit dem cdk1-Inhibitor (RO3306) und für weitere 48 h mit einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitorkombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

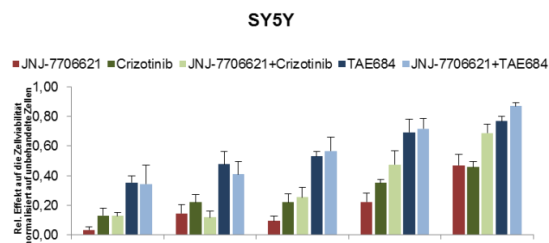
Ergebnisse

JNJ-7706621 Behandlung mit anschließender ALK Inhibition

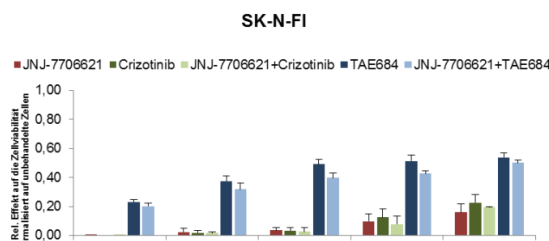
Eine hohe Konzentration des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621 (4 μM), mit anschließender Behandlung von hohen Konzentrationen des ALK Inhibitors, Crizotinib (1,6 μM), führte zu einer synergistischen Inhibition der Zellproliferation.



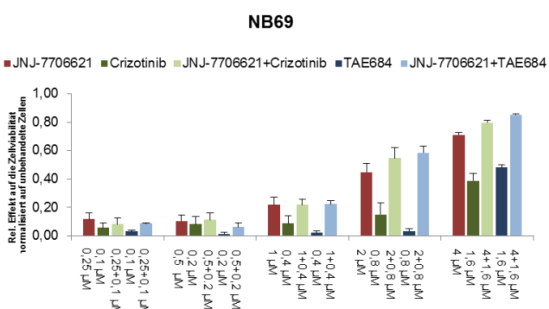
| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μM +0,1 μM | 0,99 | Nahezu additiv | 2,21 | antagonistisch |
| 0,5 μM +0,2 μM | 1,55 | antagonistisch | 2,88 | antagonistisch |
| 1 μM +0,4 μM | 1,30 | Mäßig antagonistisch | 1,64 | antagonistisch |
| 2 μM +0,8 μM | 1,83 | antagonistisch | 1,66 | antagonistisch |
| 4 μM +1,6 μM | 1,51 | antagonistisch | 1,59 | antagonistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μM +0,1 μM | 0,81 | Mäßig synergistisch | 1,12 | Leicht antagonistisch |
| 0,5 μM +0,2 μM | 1,80 | antagonistisch | 1,49 | antagonistisch |
| 1 μM +0,4 μM | 1,30 | Mäßig synergistisch | 1,17 | Leicht antagonistisch |
| 2 μM +0,8 μM | 0,91 | nahezu additiv | 0,89 | Leicht synergistisch |
| 4 μM +1,6 μM | 0,70 | Mäßig synergistisch | 0,45 | synergistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|---------------------------------------|------------------------|----------------|--------------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μM +0,1 μM | 1,97 | antagonistisch | 2,45 | antagonistisch |
| 0,5 μM +0,2 μM | 1,04 | Nahezu additiv | 1,41 | mäßig antagonistisch |
| 1 μM +0,4 μM | 1,62 | antagonistisch | 1,42 | Mäßig antagonistisch |
| 2 μM +0,8 μM | 2,12 | antagonistisch | 2,22 | antagonistisch |
| 4 μM +1,6 μM | 2,99 | antagonistisch | 2,57 | antagonistisch |



| | JNJ-7706621+Crizotinib | | JNJ-7706621+TAE684 | |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μM +0,1 μM | 1,38 | Mäßig antagonistisch | 1,01 | Nahezu additiv |
| 0,5 μM +0,2 μM | 1,90 | antagonistisch | 2,76 | antagonistisch |
| 1 μM +0,4 μM | 1,76 | antagonistisch | 1,50 | antagonistisch |
| 2 μM +0,8 μM | 0,85 | Leicht synergistisch | 0,72 | Mäßig synergistisch |
| 4 μM +1,6 μM | 0,56 | synergistisch | 0,41 | synergistisch |

Abbildung 27: Effekte des sukzessiven Behandlungsansatzes unter Einsatz des pan cdk-Inhibitors, JNJ-7706621, mit anschließender ALK Inhibition auf die Zellviabilität.

Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SK-N-FI, NB69) wurden nacheinander für 24 h mit dem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) und für weitere 48 h mit einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitorkombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

In den IMR32- und SK-N-FI Zellen ließen sich bei dem sukzessiven Einsatz von JNJ-7706621 und Crizotinib sowie TAE684 fast über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich nur antagonistische Effekte nachweisen. Es konnte lediglich ein additiver Effekt in den IMR32 Zellen bei der Kombination von 0,25 μM JNJ-7706621 und 0,1 μM Crizotinib beobachtet werden und bei den SK-N-FI war es die Kombination aus 0,5 μM JNJ-7706621 und 0,2 μM Crizotinib, die zu einem additiven Resultat führte. Die Kombination aus der Vorbehandlung mit 2 μM bzw. 4 μM JNJ-7706621 und einer Folgebehandlung mit 0,8 μM und 1,6 μM TAE684 wirkte synergistisch auf die SY5Y- und NB69 Zellen.

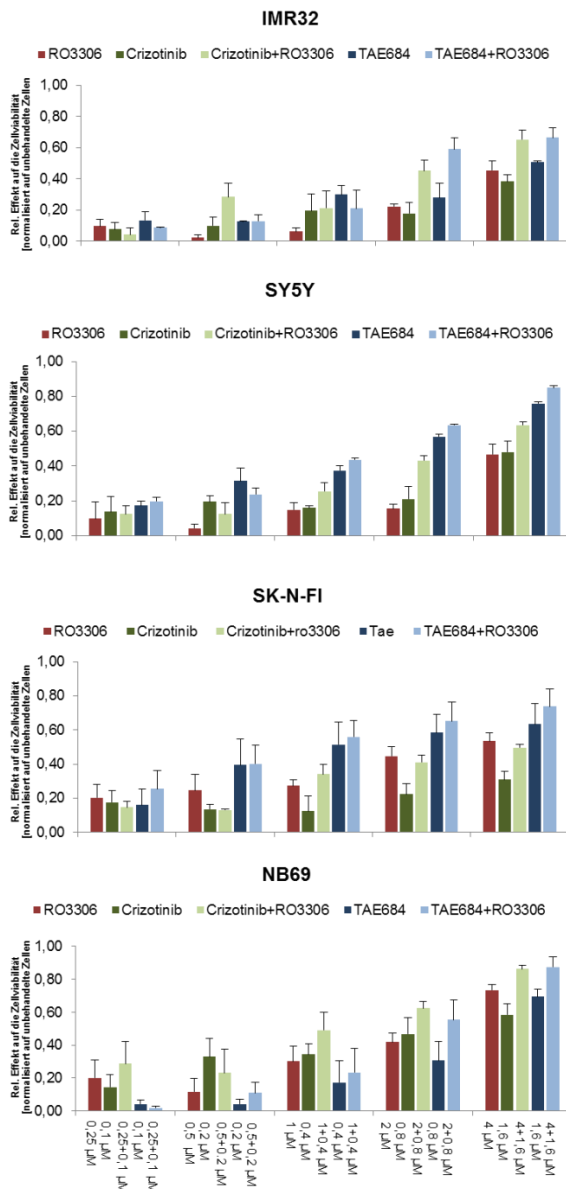
5.6.2.2 ALK-Inhibition und anschließende cdk1-Inhibition

In den nächsten beiden Kapiteln wird die andere sukzessive Therapiestrategie beschrieben. Hierbei wird zunächst ALK durch die Inhibitoren Crizotinib bzw. TAE684 gehemmt und anschließend die cdk-Aktivität mittels RO3306 bzw. JNJ-7706621 inhibiert.

ALK-Inhibition mit anschließender RO3306 Behandlung

In dem Ansatz, in dem 24 h mit 1,6 μM Crizotinib vorbehandelt wurde und anschließend 4 μM RO3306 zugegeben wurde, konnte in allen Zellen bis auf die SK-N-FI, ein synergistischer Effekt verzeichnet werden. Die sukzessive Behandlung mit 0,8 μM bzw. 1,6 μM TAE684 und 2 μM bzw. 4 μM RO3306 zeigte ebenfalls synergistische Ergebnisse bezüglich der Inhibition der Zellproliferation in allen vier Zelllinien. Bei den SK-N-FI Zellen war ein additiver Effekt nur bei 1,6 μM TAE684 und 4 μM RO3306 festzustellen. Die sukzessive Behandlung von Crizotinib bzw. TAE684 mit RO3306 wirkte bei allen Zellen im niedrigen Konzentrationsbereich additiv oder antagonistisch.

Ergebnisse



| | Crizotinib+RO3306 | | TAE684+RO3306 | |
|--------------------------|-------------------|----------------------|---------------|---------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 3,07 | Stark antagonistisch | 1,90 | antagonistisch |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 0,33 | synergistisch | 2,17 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 1,07 | Nahezu additiv | 1,83 | antagonistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 0,52 | synergistisch | 0,16 | Stark synergistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 0,38 | synergistisch | 0,52 | synergistisch |

| | Crizotinib+RO3306 | | TAE684+RO3306 | |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 1,25 | Mäßig antagonistisch | 0,98 | Nahezu additiv |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 2,46 | antagonistisch | 1,52 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 1,12 | leicht antagonistisch | 1,13 | Leicht antagonistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 0,62 | synergistisch | 0,37 | synergistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 0,35 | synergistisch | 0,51 | synergistisch |

| | Crizotinib+RO3306 | | TAE684+RO3306 | |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 2,30 | antagonistisch | 1,24 | Mäßig antagonistisch |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 6,01 | Stark antagonistisch | 0,92 | Nahezu additiv |
| 1 μ M+0,4 μ M | 0,99 | Nahezu additiv | 0,72 | Mäßig synergistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 1,14 | Leicht antagonistisch | 0,33 | synergistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 1,21 | Mäßig antagonistisch | 0,93 | Nahe additiv |

| | Crizotinib+RO3306 | | TAE684+RO3306 | |
|--------------------------|-------------------|---------------------|---------------|-----------------------|
| Konzentration | CI-Wert | Bedeutung | CI-Wert | Bedeutung |
| 0,25 μ M+0,1 μ M | 0,71 | Mäßig synergistisch | 10,21 | Nahezu additiv |
| 0,5 μ M+0,2 μ M | 2,07 | antagonistisch | 2,91 | antagonistisch |
| 1 μ M+0,4 μ M | 0,94 | Nahezu additiv | 2,45 | Leicht antagonistisch |
| 2 μ M+0,8 μ M | 0,96 | Nahezu additiv | 0,53 | synergistisch |
| 4 μ M+1,6 μ M | 0,39 | synergistisch | 0,60 | synergistisch |

Abbildung 28: Effekte der sukzessiven Behandlung mit ALK-Inhibitoren und anschließender Behandlung mit einem cdk1-Inhibitor (RO3306) auf die Zellviabilität.

Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SKNFI, NB69) wurden nacheinander für 24 h mit einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) und für weitere 48 h mit dem cdk1-Inhibitor RO3306 behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitorkombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

Ergebnisse

ALK Inhibition mit anschließender JNJ-7706621 Behandlung

Auch hier zeigte sich, dass der Einsatz von 1,6 μM Crizotinib und 4 μM JNJ-7706621 einen synergistischen Effekt auf die Zellviabilität hat. Bei den SK-N-FI Zellen wirkten auch schon niedrige Konzentrationen synergistisch

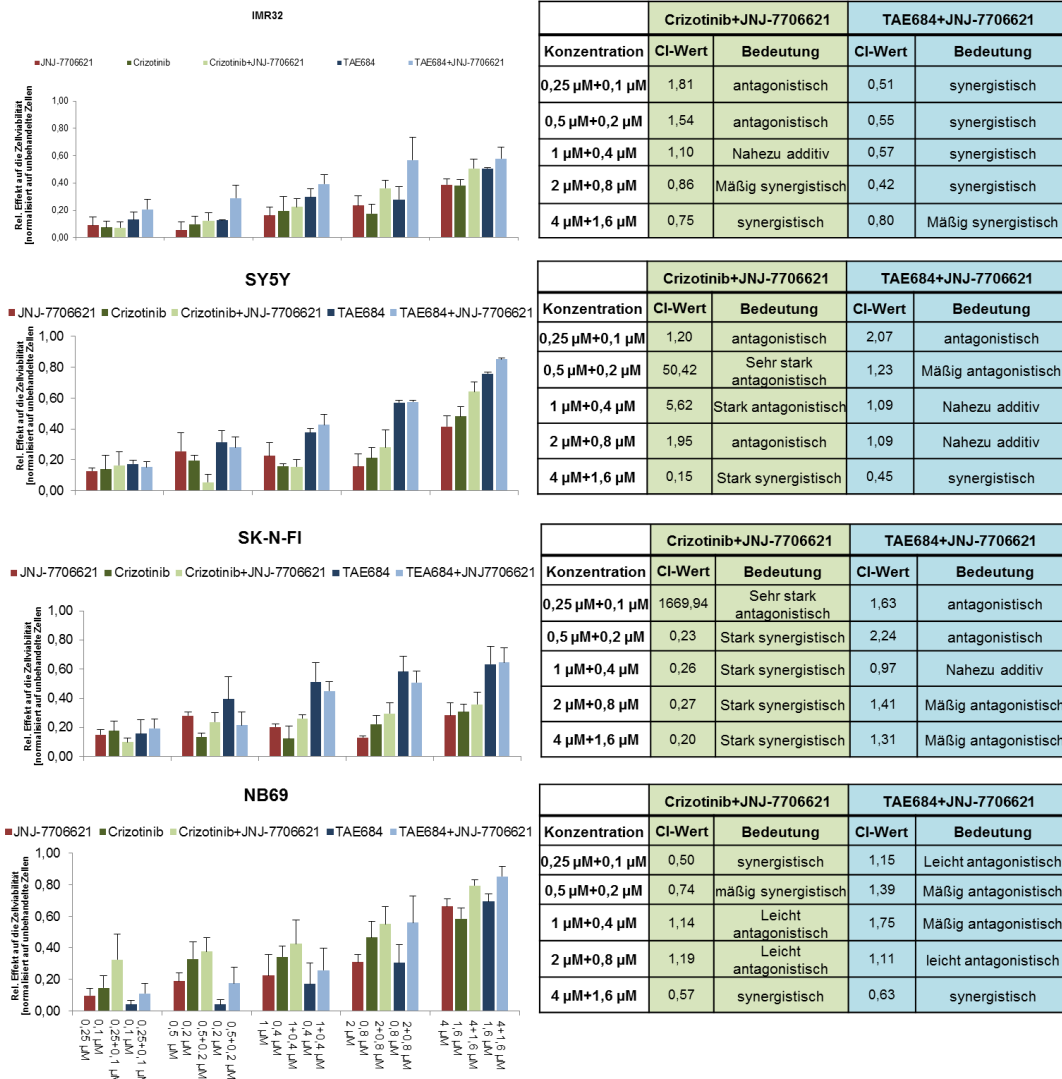


Abbildung 29: Effekte der sukzessiven Behandlung mit ALK-Inhibitoren und anschließender Behandlung mit einem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) auf die Zellviabilität. Die Neuroblastomzelllinien (IMR32, SY5Y, SK-N-FI, NB69) wurden nacheinander für 24 h mit einem der ALK-Inhibitoren (Crizotinib bzw. TAE684) und für weitere 48 h mit dem pan cdk-Inhibitor (JNJ-7706621) behandelt. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden mittels MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in den Balkendiagrammen dargestellt. In den Tabellen befinden sich die zu den jeweiligen Inhibitorkombinationen gehörenden Kombinationsindices (CI) mit der entsprechenden Bewertung der kombinatorischen Effekte.

Ergebnisse

Nur der Ansatz mit den beiden niedrigsten Konzentrationen (0,1 μ M Crizotinib + 0,25 μ M JNJ-7706621) wirkte stark antagonistisch auf die Zellen. Die sukzessive Behandlung von TAE684 und JNJ-7706621 wirkt in den IMR32 Zellen, in denen das ALK-Gen teilweise amplifiziert vorliegt, in allen Ansätzen mäßig synergistisch bis synergistisch. Die Kombination aus den höchsten Konzentrationen wirkte auf die SY5Y- und NB69 Zellen synergistisch. Nur in den SK-N-FI Zellen zeigte die sukzessive Behandlung von TAE684 und JNJ-7706621 bei allen getesteten Konzentrationen antagonistisch Effekte (Abbildung 29).

6.Diskussion

Zellzyklusprozesse sind häufig in Tumorzellen fehlreguliert, was zu einer unkontrollierten Zellteilung führt. Mechanistisch kann diese Fehlregulation durch die Mutation oder Überexpression von Zellzyklusregulatoren wie zum Beispiel cdk's oder Cyclinen begründet sein (Hanahan und Weinberg 2011; Lapenna und Giordano 2009). Trotz der komplexen genetischen und epigenetischen Veränderungen in Tumorzellen, kann das Wachstum der Zellen durch die Inaktivierung eines einzigen Onkogenes gehemmt werden. Weinstein und Joe sprechen bei diesem Phänomen von der Onkogenen-Abhängigkeit („oncogene-addiction“) (Weinstein und Joe 2008). Diese Theorie verstärkt die Annahme, dass die pharmakologische Inhibition von cdk1 ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung von Neuroblastomen ist.

6.1 Bedeutung von Zellzyklusregulatoren wie die Cyclin-abhängigen Kinasen und die Cycline im Neuroblastom

Die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen werden durch die cdk/Cyclin Komplexe reguliert. In verschiedenen Tumorarten sind diese Proteine mutiert oder überexprimiert (Motokura und Arnold 1993; Yasui et al. 1993; Hinds et al. 1994; Cicek und Valius 2011). Dies trägt zu der für Tumorzellen charakteristischen Dysregulation der Proliferation bei. Die Reanalyse der Exon Array Daten primärer NBs (Eschenburg et al. 2012) zeigt, dass die Expression von cdk's und Cyclinen auch bei Neuroblastomen eng mit dem Verlauf der Krankheit verknüpft sind. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass cdk1, cdk2, cdk4 und cdk6 sowie CCNA, CCNB und CCNE mit dem Gesamtüberleben korrelieren. Diese Korrelation ist unabhängig vom MYCN Status der Tumore. Auch in Tumoren ohne MYCN Amplifikation erkennt man deutlich, dass eine hohe Expression der Zellzyklusregulatoren mit einem schlechten Verlauf der Krankheit verknüpft ist. Zudem zeigt sich, dass cdk1, cdk4, CCNB und CCNE in Tumoren mit MYCN Amplifikationen höher exprimiert werden als in Tumoren ohne MYCN Amplifikationen (s. 5.1). Interessanterweise stellte sich heraus, dass sowohl cdk1 als auch CCNB1 signifikant mit dem Gesamtüberleben und dem MYCN Status korrelieren. Dies spricht dafür, dass cdk1 und CCNB1 als Komplex eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression spielt. Bereits 2009 konnten Molenaar et al. zeigen, dass eine hohe cdk2 Expression im Neuroblastom mit einer schlechten Prognose verlinkt ist. Auch in anderen Tumoridentitäten, wie beispielsweise Brustkrebs, gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression bzw. der Aktivität von cdk1 bzw. CCNB1 und dem Verlauf der Krankheit (Kim et al. 2007; Chae et al. 2011; Aaltonen et al. 2009). Wie man im Punkt 5.2 sehen kann, konnte in dem Panel getesteter Zelllinien bei allen Zellen eine Überexpression

von cdk1 und CCNB1 auf mRNA- und Proteinebene festgestellt werden. Allerdings konnte in den Zelllinien keine Korrelation mit MYCN nachgewiesen werden. Zwar konnte man ein erhöhtes cdk1- bzw. CCNB1-Level im direkten Vergleich zwischen den parentalen (SH-EP) und den stabil transfizierten MYCN Zellen (WAC2) sowie im SH-EP MYCN-ER System beobachten, jedoch zeigte sich diese Tendenz nicht in den übrigen Zellen. Die Expression von cdk1 und CCNB1 kann also scheinbar durch MYCN induziert werden, ist aber nicht generell in MYCN amplifizierten oder überexprimierenden Zellen höher exprimiert. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Expressionslevel in WAC2 und in den induzierten SH-EP MYCN-ER Zellen könnte sein, dass die Expression von cdk1 und CCNB1 durch MYCN transkriptionell reguliert wird. Außerdem ist bekannt, dass MYCN an proliferativen Prozessen beteiligt ist. So konnte für WAC2 eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den parentalen SH-EP Zellen gezeigt werden (Schweigerer et al. 1990). Außerdem muss man beachten, dass die Zellen in vitro anderen Bedingungen ausgesetzt sind wie die Zellen im Tumor. Aber gerade diese externen Einflüsse können bei der transkriptionellen Regulierung von Zellzyklusregulatoren eine Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von Cyclin D und Cyclin A von der Adhäsion der Zellen abhängig ist (Bohmer et al. 1996; Zhu 1996).

Ein Zusammenhang zwischen dem MYCN Status und der Lokalisierung von cdk1 bzw. CCNB1 konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Die immunozytochemischen Untersuchungen ergaben, dass beide Proteine vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert sind. Teilweise konnte cdk1 und CCNB1 auch im Zellkern gefunden werden (s. 5.3). Bekannt ist, dass die Lokalisation des cdk1/CCNB1 Komplex von der Zellzyklusphase abhängig ist (Mossé et al. 2008). Während der Interphase kommt es zu einem ständigen Austausch von CCNB1 zwischen Zytoplasma und Zellkern. Dabei ist die Exportrate aus dem Zellkern höher als der Import (Hagting et al. 1998; Yang et al. 1998; Toyoshima et al. 1998). Erst in der Prophase kommt es zu einer Akkumulation des cdk1/CCNB1 Komplexes im Nukleus, wo er eine Reihe von Substraten phosphoryliert, die maßgebend an dem Zellzyklusprozess beteiligt sind (Gavet und Pines 2010). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die in dieser Arbeit durchgeführten immunozytochemischen Untersuchungen. Jedoch scheint die Lokalisation von CCNB1 eine entscheidende Rolle zu spielen. So wird die CCNB1 Lokalisation bei Brustkarzinomen als prognostischer Faktor beschrieben. Hier besteht ein Zusammenhang zwischen der Kern-Lokalisation von CCNB1 und einer schlechter Prognose (de Brouwer et al. 2010). Für das Neuroblastom liegen hierfür keine Studien vor.

6.2 siRNA vermittelte Herunterregulation der cdk1- bzw. CCNB1-Expression im Neuroblastom

Es konnte bereits in verschiedenen Krebsarten gezeigt werden, dass die Herunterregulation von CCNB1 zu einer Hemmung der Proliferation und zu einer Zunahme der Apoptose führt. (Yuan et al. 2004; Androic et al. 2008; Akimov et al. 2011). Die im Punkt 5.4 gezeigten Experimente können dies auch für Neuroblastomzellen bestätigen. Die Herunterregulation von cdk1 bzw. CCNB1 führt zu einer Abnahme der Zellproliferation. Bei der Behandlung der Zellen mit der Negativ-Kontroll-siRNA ergab sich jedoch das Problem, dass die Zellviabilität stark beeinflusst wurde. Nach Optimierung der Transfektion und Austestung diverser Negativ-Kontrollen ist es gelungen, dass im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die Zellviabilität, der mit der Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Zellen, bei 80 % lag. Vergleicht man die knock-down Zellen mit den unbehandelten Kontrollen lässt sich eine Verringerung der Zellproliferation durch den Knock-down von CCNB1 bis auf ca. 40 % beobachten. Betrachtet man hingegen die Unterschiede zwischen den knock-down Zellen und den Zellen, die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert wurden, so ist der Unterschied deutlich geringer. Die Ergebnisse zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem MYCN-Status und dem Effekt auf die Zellviabilität. Zumindest zeigte sich kein Unterschied zwischen der ektopisch MYCN exprimierenden Zelllinie, WAC2, und der parentalen Zelllinie SH-EP. Aus der Literatur gab es Hinweise, dass der Knock-down von cdk1 vor allem in MYCN getriebenen Tumorzellen eine Wirkung auf die Zellproliferation hat (Kang et al. 2014). In unserem Zellpanel deutet sich jedoch eine Abhängigkeit des p53 Status an. So ist der Effekt auf die beiden p53 mutierten Zelllinien (SK-N-FI und NLF) am geringsten. Auf mRNA Ebene allerdings sind die knock-down Effizienzen in den p53 mutierten Zellen im Vergleich zu den anderen Zellen niedriger. Auf Proteinebene konnten jedoch in allen getesteten Zellen bis auf Ausnahme von NB69 vergleichbare knock-down Effizienzen erzielt werden (5.4.1). Da für die Untersuchung der Funktionalität von cdk1 bzw. CCNB1 die Herunterregulation der Proteinexpression eine größere Rolle spielt als die Herunterregulation der mRNA-Level bleiben die Ergebnisse des Zellviabilitäts-Assays repräsentativ.

Um die bei der siRNA Transfektion beobachtete p53 Abhängigkeit näher zu untersuchen und mögliche off-Target Effekte der cdk1 bzw. CCNB1 siRNAs zu untersuchen wurde cdk1 für weitere Untersuchungen pharmakologisch inhibiert.

6.3 Pharmakologische Inhibition von cdk's, insbesondere von cdk1, im Neuroblastom

In den letzten Jahren wurde intensiv nach neuen Inhibitoren geforscht, die sich gegen Proteine des Zellzyklus richten. Alleine 14 cdk-Inhibitoren wurden bereits in klinische Studien erprobt. Bis dato stellte sich keiner davon so vielversprechend dar, dass er es in die klinische Verwendung geschafft hätte (Lapenna und Giordano 2009). Somit ist es notwendig weitere cdk-Inhibitoren zu untersuchen. Vorherige Studien zeigten, dass cdk's als therapeutisches Target durchaus bei der Behandlung von Neuroblastomen in Betracht gezogen werden könnten. So stellten sich die pan cdk-Inhibitoren SNS-032 und Roscovitin als wirkungsvolle Proliferationshemmer und Apoptoseauslöser bei Neuroblastomzellen dar (Molenaar et al. 2009; Löschmann et al. 2013). Vor allem die Inhibition von cdk2 wird als mögliche Behandlungsoption für MYCN amplifizierte/überexprimierende Neuroblastome in Betracht gezogen (Verissimo et al. 2011; Molenaar et al. 2009). Hierbei spielt das Konzept der „synthetische Letalität“ eine wesentliche Rolle. Zwei Gene stehen dabei in einer synthetisch letalen Interaktion wenn die Ausschaltung oder Inhibition eines Genes nur in einem letalen Kontext mit dem Vorkommen eines mutierten oder aktivierten Onkogenes steht (Molenaar et al. 2009). Die Korrelation der cdk1 Expression mit aggressiven Neuroblastomen macht auch cdk1 zu einem potentiellen therapeutischen Target. Cdk1 ist zudem die einzige Cyclin-abhängige Kinase, die essentiell für den Zellzyklus ist. Cdk1 ist in der Lage, den Ausfall von cdk2, cdk4 und cdk6 durch die Bildung aktiver Komplexe mit Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D und Cyclin E zu kompensieren (Santamaría et al. 2007; Padmakumar et al. 2009; Aleem et al. 2005). Um die Inhibition von cdk1 als mögliche Behandlungsoption zu untersuchen, haben wir Neuroblastomzelllinien zum einen mit einem spezifischen cdk1-Inhibitor ,RO3306, und zum anderen mit einem pan cdk-Inhibitor, JNJ-7706621, der eine hohe Affinität zu cdk1 und cdk2 aufweist, im Neuroblastomzelllinien untersucht. Der spezifische cdk1-Inhibitor, RO3306, wurde 2006 von Vassilev et al. identifiziert und seine apoptotische Wirkung auf Krebszellen beschrieben. Die Spezifität des Inhibitors für cdk1 konnte durch die Abnahme der Phosphorylierung der Protein Phosphatase 1 alpha (PP1 α) auch in den hier gezeigten Versuchen (5.5.2) nachgewiesen werden. Die cdk4 spezifische Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) hingegen wurde durch die Behandlung von RO3306 in den Zellen nicht beeinflusst. Die getesteten Zelllinien reagierten auf die Behandlung mit den Inhibitoren mit einer Abnahme der Zellviabilität. Alle Neuroblastomzellen reagierten empfindlicher auf die Inhibitoren als die nicht tumorigene Fibroblastenzelllinie. Dies unterstreicht die tumorspezifische Wirkung von RO3306 und JNJ-7706621. Vorherigen Veröffentlichungen zufolge gibt es einen Zusammenhang zwischen dem MYCN Status und der Inhibitor Effizienz von cdk-Inhibitoren. So konnten Goga et al. beispielweise zeigen, dass die Inhibition von cdk1 besser in MYCN überexprimierenden und amplifizierten Tumoren

wirkt (Goga et al. 2007). Beschrieben ist auch, dass MYCN amplifizierte Neuroblastomzellen sensitiver auf die beiden pan cdk-Inhibitoren Roscovitin und Purvalanol A reagieren als Zellen ohne MYCN Amplifikation (Chen et al. 2013). In dieser Arbeit konnte eine solche Verbindung zwischen MYCN und der Inhibitor Effizienz von RO3306 und JNJ-7706621 nicht gezeigt werden. Die pan cdk-Inhibitoren Purvalanol A und Roscovitin zeigen neben cdk1 noch hohe Affinitäten für cdk2 und cdk5 (Villerbu et al. 2002; Meijer et al. 1997). So lässt sich vermuten, dass die für diese Inhibitoren beobachtete MYCN-Abhängigkeit durch die Inhibition der anderen cdks verursacht wird. An dieser Stelle muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass es keine Expressionsunterschiede in Bezug auf den MYCN Status gab. Die Exon Array Daten primärer Neuroblastome (Eschenburg et al. 2012) deuteten hingegen darauf hin, dass Neuroblastome mit einer MYCN Amplifikation höhere Level an cdk1 besitzen. Auszuschließen ist deshalb nicht, dass Tumore mit MYCN Amplifikation und somit höheren cdk1 Leveln sensibler auf die cdk1 Inhibition reagieren. Hierzu wären weitere in vivo Versuche notwendig.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der p53 Status die Inhibitoreffizienz beeinflusst. Zelllinien, die eine p53 Mutation tragen, scheinen resistenter gegenüber der Inhibitorbehandlung zu sein (s. 5.5.1). Dieser Zusammenhang wurde bisher bei keinem der beiden cdk-Inhibitoren beschrieben. In anderen Arbeiten wurde der Effekt von JNJ-7706621 auf die Zellproliferation als unabhängig von p53 Status beschrieben (Emanuel 2005). Bei dem Tumorsuppressor p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der vor allem den Erhalt der Zellzykluskontrolle und die genomische Integrität erhalten soll. Daher wird der Transkriptionsfaktor p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Bei DNA Schädigungen verhindert p53, dass der Zellzyklus fortgesetzt wird. Dies kann durch einen Zellzyklusarrest und/oder durch die Einleitung der Apoptose gewährleistet werden (George 2011). P53 reguliert die Transkription verschiedener pro-apoptotischer Faktoren wie zum Beispiel BAX oder PUMA (Fridman und Lowe 2003) und spielt sowohl eine Rolle bei dem extrinsischen als auch beim intrinsischen Apoptoseweg (Haupt 2003). Unser Ergebnis, dass p53 mutierte Zellen resistenter gegenüber den cdk-Inhibitoren sind, deutet somit darauf hin, dass der p53 Signalweg eine entscheidende Rolle bei der cdk1 Inhibition spielt.

6.4 Rolle des p53-Status bei der cdk1 Inhibition

Es zeigte sich, dass Zellen mit einer p53 Mutation (SK-N-FI, NLF) höhere IC₅₀-Werte aufwiesen als p53 wt Zellen. Dies veranlasste uns, den Effekt von p53 auf die cdk-Inhibitor Effizienz näher zu untersuchen. Dazu wurden Zellen verwendet, die lentiviral mit shRNA gegen p53 transfiziert wurden (van Maerken et al. 2006). Vergleicht man die IC₅₀-Werte der Kontrollzellen mit den p53 knock-down Zellen, stellt man fest, dass die knock-down Zellen höhere Werte aufweisen. Lediglich bei den NGPs lagen die IC₅₀-Werte sowohl bei den

Kontrollzellen als auch bei den knock-down Zellen bei der cdk Inhibition durch JNJ-7706621 bei 3,1 μM (s. 5.5.3). Die hohen IC₅₀-Werte der NGP Zellen könnte darin begründet sein, dass diese Zellen eine MDM2 Amplifikation besitzen (Corvi et al. 1995). MDM2 ist ein Negativregulator von p53 und kontrolliert die transkriptionelle und translationelle Aktivität von p53 (Manfredi 2010). Um eine weitere Bestätigung der p53 Abhängigkeit zu erhalten, wurde eine Medulloblastomzelllinie, die mit einer dominant negativ exprimierenden Form von p53 transfiziert worden ist (Henssen et al. 2013), getestet. Auch hier zeigt sich, dass die Zellen, die eine dominant negativen p53 Isoform exprimieren, unempfindlicher gegen RO3306 und JNJ-7706621 sind. Außerdem zeigte sich, dass die durch den cdk1-Inhibitor verursachten Effekte auf den Zellzyklus abhängig vom p53 Status der Zellen sind. Sowohl bei den p53 mutierten als auch bei den p53 knock-down Zellen (IMR32-LV-h-p53) und der p53 dominant negativ exprimierenden Medulloblastomzelllinie zeigte sich zusätzlich zu dem Anstieg der subG1-Phase ein Anstieg der G2-Phase. Cdk1 spielt eine entscheidende Rolle bei dem Übergang der M- zu G2-Phase, daher überrascht der beobachtete G2-Arrest nicht (Morgan 1995; Landry et al. 2014). Auch Vassilev et al. beschreiben einen Anstieg der G2-Phase in Tumorzellen nach der Behandlung mit RO3306. Interessant ist jedoch, dass dieser Effekt nur bei p53 mutierten Zellen zu beobachten ist. Eine Erklärung hierfür könnte die Aktivierung des Apoptose induzierenden p53 Signalweges durch RO3306 in den p53 wt Zellen sein. In dieser Arbeit konnte nicht nur ein Zusammenhang zwischen der Inhibitoreffizienz und dem p53 Status nachgewiesen werden, es konnte auch gezeigt werden, dass durch die Behandlung von RO3306 der p53 Signalweg aktiviert wird. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigen eine Zunahme der p53 Proteinexpression sowie einen Anstieg der mRNA- und Proteinlevel des p53 downstream Target p21. Ebenfalls konnten erhöhte mRNA Expressionen weiterer Zielgene (BAX und MDM2) von p53 beobachtet werden (5.5.8). Eine Aktivierung des p53 Signalweges ist auch schon für die Behandlung mit Roscovitin, einem pan cdk-Inhibitor, beschrieben (Lu et al. 2001; Ljungman und Paulsen 2001). Eine Erklärung hierfür lieferten Kreis et al., indem sie zeigen konnten, dass es durch die Runterregulation von CCNB1 und der damit verbundenen fehlenden cdk1 Aktivität zu einer Stabilisierung von p53 durch die ausbleibende Phosphorylierung am Serin 315 kommt (Kreis et al. 2010). Die Aktivierung des p53 Signalweges kann zur Einleitung der Apoptose führen und ist somit eine Erklärung für die in den p53 wt beobachtete Apoptose (Haupt 2003). Die Tatsache, dass auch in den p53 mutierten Zellen vergleichbare Apoptoselevel gemessen werden konnten, weist darauf hin, dass die Inhibition von cdk1 einen p53-unabhängigen Signalweg auslösen kann. Die Aktivierung der Caspase-8 und -9 in den p53 wt und mutierten Zellen deuten auf eine Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptoseweges hin (Haupt 2003). Die Verringerung der mitochondrialen Aktivität wie wir sie in dem Versuch in 5.5.6 sehen konnten ist ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung des intrinsischen Signalweges. Vor

kurzem konnte zudem von Wang et al. gezeigt werden, dass der cdk1/CCNB1 Komplex eine Rolle bei der mitochondrialen Atmung spielt. Der cdk1/CCNB1 phosphoryliert eine Reihe von mitochondrialen Proteinen wie die Komplex I Untereinheit der respiratorischen Atmungskette und steigert so die mitochondriale Aktivität während dem Übergang von der G2- zur M-Phase in den Zellen (Wang et al. 2014; Rosenthal 2014). Bereits bekannt ist auch, dass während des Zellzyklus der cdk1/CCNB1 Komplex die Caspase-9 an einer inhibitorischen Phosphorylierungsstelle, (Thr125) phosphoryliert und so die Caspase Aktivität unterdrückt wird. Bei Inhibition von cdk1 kommt es also zu einem Anstieg der Caspase-9 Aktivität, so wie wir und andere ihn auch beobachten konnten (Allan und Clarke 2007).

p53 scheint daher eine entscheidende Rolle bei der Inhibition von cdk1 zu spielen. Zum einen beeinflusst der p53 Status die Inhibitoreffizienz und zum anderen wird der p53 Signalweg durch die cdk1 Inhibition aktiviert. P53 ist im Neuroblastom mit ca. 2 % eine eher geringe Mutation, ist aber in Rezidiven und in chemotherapierten Tumoren gehäuft zu beobachten (Carr-Wilkinson et al. 2010; Tweddle et al. 2003). Damit sind diese Ergebnisse essentiell für die cdk1 basierte Therapieansätze.

6.5 Wirkung von Cdk-Inhibitoren in Kombination mit ALK-Inhibitoren

Die duale Inhibition von ALK und cdk5/6 wirkt synergistisch auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen (A.Wood, CHOP, USA). In dieser Arbeit sollten daher die Effekte einer dualen Inhibition von cdk1 bzw. cdk5 und ALK näher untersucht werden. Die ALK-Inhibitoren Crizotinib und TAE684 haben gute Wirkungen auf ALK getriebene Tumore, sprich auf Tumore mit ALK aktivierenden Mutationen. Zellen mit einer ALK_{F1174L} Mutation, so wie sie in den SY5Y Zellen vorliegt, zeigen eine schlechtere Responsivität auf den ALK-Inhibitor Crizotinib (Bresler et al. 2011). Daher ist es wichtig, neue Ansätze zu entwickeln, um die Sensitivität von Zellen mit einer solchen Mutation zu erhöhen. Eine Verbesserung der Responsivität auf Crizotinib bei Zellen mit einer ALK_{F1174L} Mutation konnte auch schon durch die Kombination aus Crizotinib und mTOR-Inhibitoren von Moore et al. beschrieben werden (Moore et al. 2014). Eine interessante Fragestellung ist nun, ob man die gegen cdk1 Inhibition resistenten p53 mutierten Zellen, für die Behandlung mit ALK-Inhibitoren sensitiveren kann. Hierzu wird eine Zelllinie, in der das ALK-Gen amplifiziert vorliegt und eine Zelllinie, die wildtyp für ALK und p53 ist, getestet. Bei der dualen Therapie zeigten sich deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Kombinationen der Inhibitoren. Die simultane Zugabe von RO3306 und Crizotinib hatte zum Beispiel einen antagonistischen Effekt auf die p53 mutierten SK-N-FI Zellen. Wohingegen die Kombination aus RO3306 und TAE684 synergistisch wirkte. Zudem zeigten sich Abhängigkeiten bezüglich der Konzentration. Häufig wirkte nur der Einsatz von hohen Dosen synergistisch und niedrige Dosen führten zu einem antagonistischen Effekt. Auch die Reihenfolge der Applikation der Inhibitoren scheint eine

Rolle zu spielen. Die besten CI-Werte konnten für die duale cdk1 Inhibition durch RO3306 und ALK entweder durch die simultane Behandlung oder durch die 24-stündige Vorbehandlung mit einem der ALK-Inhibitoren und anschließender cdk1 Inhibition ermittelt werden. Auch bei der Kombination des pan cdk-Inhibitors mit den ALK-Inhibitoren erweist sich die sukzessive Behandlung mit cdk und ALK Inhibition als unterlegen. Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Kombination aus ALK- und cdk-Inhibitoren nicht nur ein therapeutischer Ansatz für ALK_{F1174L} mutierte Zellen wäre sondern auch bei der Behandlung von ALK wt Zellen in Betracht gezogen werden könnte. Synergistische Effekte konnten sowohl in ALK amplifizierten Zellen, in ALK_{F1174L} mutierten Zellen, in p53 mutierten Zellen und in p53/ALK wt Zellen durch die Inhibition von cdk1 bzw. cdks und ALK in hohen Konzentrationen und durch die Wahl der Reihenfolge der Inhibitorzugabe erreicht werden. Geklärt werden müsste, ob eine duale Kombination Vorteile zu den alternativen Methoden von ALK/p53 wt Zellen mit sich bringt. Außerdem müssen die Signalwege der dualen Inhibition geklärt werden. Auffällig ist, dass die Kombination von Crizotinib und RO3306 in den p53 mutierten SK-N-FI Zellen weder in den simultanen noch in den sukzessiven Behandlungsansätzen synergistische Effekte zeigt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass beide Inhibitoren über den p53 Signalweg wirken (Zheng et al. 2013; Yan et al. 2014). Dies könnte auch den synergistischen Effekt in den p53 wt Zellen erklären. Die p53 Aktivität könnte durch die duale Inhibition von cdk1 und ALK verstärkt werden. Die Tatsache, dass cdks und auch ALK eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation spielen und es daher auch Überschneidungen der Signalwege gibt, lässt vermuten, dass die duale Inhibition gewisse Signalwege verstärkt. So gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Inhibition von cdks einen Einfluss auf den JAK/Stat3 Signalweg hat. Die Hemmung des JAK/Stat3 Signalweges, der eine Rolle bei der Proliferation und Apoptose spielt, könnte daher durch die duale Inhibition von cdk1 und ALK verstärkt werden (Bonvini et al. 2009). Um eine konkrete Aussage über die Wirkungsweise der dualen Inhibition vorzunehmen, sind genauere Untersuchungen der Signalwege nötig.

7. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor bei Kindern. Er entwickelt sich aus Vorläuferzellen der Neuralleiste und kann sich entlang des sympathischen Grenzstranges entwickeln. Die Heilungschancen gerade bei Rezidivpatienten sind mit einer 20 % 5-Jahres-Überlebensrate ausgesprochen schlecht insbesondere bei Vorliegen einer MYCN Amplifikation. Deshalb ist es notwendig, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln oder bestehende zu verbessern. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit nach möglichen Targets für weitere Therapieansätze gesucht. Dazu wurden vorhandene Exon-Array-Daten primärer NB reanalysiert und nach Genen gesucht, die mit einem schlechten Überleben der Patienten korrelieren. Bei MYCN handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der mit einem sehr aggressiven Verlauf der Krankheit verknüpft ist. So wurden als mögliche Zielstrukturen die Zellzyklusregulatoren cdk1 und der dazugehörige Interaktionspartner Cyclin B1 identifiziert und standen hier im Fokus der Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass cdk1 und CCNB1 in den getesteten Neuroblastomzelllinien überexprimiert sind. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem MYCN-Status und der cdk1 bzw. CCNB1 Expression konnte in den Zelllinien jedoch nicht bestätigt werden. Gerade in den letzten Jahrzehnten wurde massiv an neuen Inhibitoren geforscht, die sich gegen Enzyme des Zellzyklus richten. Zu diesen neu entwickelten Inhibitoren gehört auch der cdk1 spezifische Inhibitor (RO3306) und der pan cdk-Inhibitor (JNJ-77706621). Die beiden Inhibitoren wurden in dieser Arbeit verwendet, um die cdk1 Aktivität zu hemmen und so cdk1 als potentielles Therapieziel zu validieren. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen dem Effekt der Inhibitoren und dem p53 Status der Zellen festgestellt werden. Zellen mit einer p53 Mutation bzw. einem geringen p53 Level zeigten sich wesentlich resistenter gegenüber beiden Inhibitoren. Des Weiteren konnte eine Aktivierung des p53 Signalweges durch RO3306 in den p53 wt Zellen nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die durch RO3306 ausgelöste Apoptose durch Caspasen vermittelt wird. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die duale Inhibition von cdk1 und dem NB-spezifischen Onkogen ALK unter definierten Bedingungen einen synergistischen Effekt auf die Zellviabilität haben kann.

Abschließend lässt sich sagen, dass unter Berücksichtigung des p53 Status die cdk1-Inhibition als Therapieansatz im Neuroblastom denkbar wäre. Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, müssten die generierten Ergebnisse in „in vivo“ Versuchen validiert werden.

8. Summary

Neuroblastoma (NB) is the most solid extracranial tumor of childhood. It originates from precursors of the neural crest and normally arises along the sympathetic trunk in the abdomen or neck. The curing prospects of relapse patients are markedly bad with a 5-year-survival-rate of 20 %. Disease recurrence frequently affects patients harboring specific MYCN gene amplification. Therefore it is necessary to develop new therapies or to optimize the old ones. To explore future therapy opportunities Exon Array data of primary NBs were reanalyzed for genes correlating with overall survival. By doing so, we identified master regulators of the cell cycle, cdk1 and the corresponding interaction partner Cyclin B1, as candidate genes. In this thesis it could be shown that cdk1 and CCNB1 were overexpressed in neuroblastoma cell lines. No correlation between cdk1 or CCNB1 expression and MYCN status could be confirmed in these cells. As novel cell cycle inhibitors were developed in recent years, both a cdk1 specific inhibitor (RO3306) as well as a pan cdk-inhibitor (JNJ-7706621) were used in this thesis to inhibit cdk1 activation and to evaluate cdk1 as potential target for NB therapy.

Interestingly, sensitivity to inhibitor treatment correlated with the p53 status of the cells. Cells harboring p53 mutations or presenting with lower p53 levels were more resistant to the inhibitors than p53 wt cells. Additionally it was shown that RO3306 activated the p53 signaling pathway as well as caspase mediated apoptosis. Furthermore, it was shown that the dual inhibition of cdk1 and NB-specific oncogene ALK has synergistic effects on cell viability depending on inhibitor concentration and on the order of treatment administration.

Taken together cdk1 inhibition warrants further investigations as therapeutic approach in neuroblastoma given that the p53 status is taken into account. These findings deserve validation in “in vivo” experiments.

9. Literaturverzeichnis

- Aaltonen, K.; Amini, R-M; Heikkilä, P.; Aittomäki, K.; Tamminen, A.; Nevanlinna, H.; Blomqvist, C. (2009): High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. In: *Br J Cancer* 100 (7), S. 1055–1060.
- Akimov, I. A.; Chernolovskaya, E. L.; Spitsyna, Yu E.; Ryabchikova, E. I.; Zenkova, M. A. (2011): Silencing of Her2, CCNB1 and PKC Genes by siRNA Results in Prolonged Retardation of Neuroblastoma Cell Division. In: *Acta Naturae* 3 (3), S. 29–39.
- Aleem, Eiman; Kiyokawa, Hiroaki; Kaldis, Philipp (2005): Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. In: *Nat. Cell Biol* 7 (8), S. 831–836.
- Allan, Lindsey A.; Clarke, Paul R. (2007): Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis. In: *Molecular Cell* 26 (2), S. 301–310.
- Androic, Ilija; Krämer, Andrea; Yan, Ruilan; Rödel, Franz; Gätje, Regine; Kaufmann, Manfred; Strebhardt, Klaus; Yuan, Juping (2008): Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. In: *BMC Cancer* 8 (1), S. 391.
- Berthold, F.; Hero, B. (2000): Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. In: *Drugs* 59 (6), S. 1261–1277.
- Bhatnagar, Sushmita Nitin; Sarin, Yogesh Kumar (2012): Neuroblastoma: A Review of Management and Outcome. In: *Indian J Pediatr* 79 (6), S. 787–792.
- Bohmer, R. M.; Scharf, E.; Assoian, R. K. (1996): Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. In: *Molecular Biology of the Cell* 7 (1), S. 101–111.
- Bonvini, P.; Zorzi, E.; Mussolin, L.; Monaco, G.; Pigazzi, M.; Basso, G.; Rosolen, A. (2009): The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol on anaplastic large cell lymphoma cells and relationship with NPM-ALK kinase expression and activity. In: *Haematologica* 94 (7), S. 944–955.
- Bresler, S. C.; Wood, A. C.; Haglund, E. A.; Courtright, J.; Belcastro, L. T.; Plegaria, J. S.; Cole, K.; Toporovskaya, Y.; Zhao, H.; Carpenter, E. L.; Christensen, J. G.; Maris, J. M.; Lemmon, M. A.; Mosse, Y. P. (2011): Differential Inhibitor Sensitivity of Anaplastic Lymphoma Kinase Variants Found in Neuroblastoma. In: *Science Translational Medicine* 3 (108), S. 108-114.

- Brodeur, G. M.; Pritchard, J.; Berthold, F.; Carlsen, N. L.; Castel, V.; Castelberry, R. P.; Bernardi, B. de; Evans, A. E.; Favrot, M.; Hedborg, F. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. In: *J. Clin. Oncol* 11 (8), S. 1466–1477.
- Brodeur, G.; Seeger, R.; Schwab, M.; Varmus, H.; Bishop, J. (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. In: *Science* 224 (4653), S. 1121–1124.
- Brodeur, Garrett M. (2003): Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. In: *Nat. Rev. Cancer* 3 (3), S. 203–216.
- Brouwer, S. de; Preter, K. de; Kumps, C.; Zabrocki, P.; Porcu, M.; Westerhout, E. M.; Lakeman, A.; Vandesompele, J.; Hoebeeck, J.; van Maerken, T.; Paepe, A. de; Laureys, G.; Schulte, J. H.; Schramm, A.; van Den Broecke, C.; Vermeulen, J.; van Roy, N.; Beiske, K.; Renard, M.; Noguera, R.; Delattre, O.; Janoueix-Lerosey, I.; Kogner, P.; Martinsson, T.; Nakagawara, A.; Ohira, M.; Caron, H.; Eggert, A.; Cools, J.; Versteeg, R.; Speleman, F. (2010): Meta-analysis of Neuroblastomas Reveals a Skewed ALK Mutation Spectrum in Tumors with MYCN Amplification. In: *Clinical Cancer Research* 16 (17), S. 4353–4362.
- Carr-Wilkinson, J.; O'Toole, K.; Wood, K. M.; Challen, C. C.; Baker, A. G.; Board, J. R.; Evans, L.; Cole, M.; Cheung, N.-K V.; Boos, J.; Kohler, G.; Leuschner, I.; Pearson, A. D.J.; Lunec, J.; Tweddle, D. A. (2010): High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. In: *Clinical Cancer Research* 16 (4), S. 1108–1118.
- Cayrol, C.; Knibiehler, M.; Ducommun, B. (1998): p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. In: *Oncogene* 16 (3), S. 311–320.
- Cazes, A.; Louis-Brennetot, C.; Mazot, P.; Dingli, F.; Lombard, B.; Boeva, V.; Daveau, R.; Cappel, J.; Combaret, V.; Schleiermacher, G.; Jouannet, S.; Ferrand, S.; Pierron, G.; Barillot, E.; Loew, D.; Vigny, M.; Delattre, O.; Janoueix-Lerosey, I. (2013): Characterization of Rearrangements Involving the ALK Gene Reveals a Novel Truncated Form Associated with Tumor Aggressiveness in Neuroblastoma. In: *Cancer Research* 73 (1), S. 195–204.
- Chae, Seoung Wan; Sohn, Jin Hee; Kim, Dong-Hoon; Choi, Yoon Jung; Park, Yong Lai; Kim, Kyungeun; Cho, Young Hye; Pyo, Jung-Soo; Kim, Jun Ho (2011): Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. In: *Yonsei Med. J* 52 (3), S. 445–453.

- Chang, Joseph T.; Wang, Hung-Ming; Chang, Ku-Wei; Chen, Wen-Ho; Wen, Ming-Chun; Hsu, Yuan-Ming; Yung, Benjamin Yat-Ming; Chen, I-How; Liao, Chun-Ta; Hsieh, Ling-Ling; Cheng, Ann-Joy (2005): Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): Overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1. In: *Int. J. Cancer* 114 (6), S. 942–949.
- Chen, Yun; Tsai, Ya-Hui; Tseng, Sheng-Hong (2013): Inhibition of cyclin-dependent kinase 1-induced cell death in neuroblastoma cells through the microRNA-34a-MYCN-survivin pathway. In: *Surgery* 153 (1), S. 4–16.
- Chen, Yuyan; Takita, Junko; Choi, Young Lim; Kato, Motohiro; Ohira, Miki; Sanada, Masashi; Wang, Lili; Soda, Manabu; Kikuchi, Akira; Igarashi, Takashi; Nakagawara, Akira; Hayashi, Yasuhide; Mano, Hiroyuki; Ogawa, Seishi (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. In: *Nature* 455 (7215), S. 971–974.
- Cicenas, Jonas; Valius, Mindaugas (2011): The CDK inhibitors in cancer research and therapy. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 137 (10), S. 1409–1418.
- Corvi, R.; Savelyeva, L.; Breit, S.; Wenzel, A.; Handgretinger, R.; Barak, J.; Oren, M.; Amler, L.; Schwab, M. (1995): Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. In: *Oncogene* 10 (6), S. 1081–1086.
- Delehouzé, C.; Godl, K.; Loaëc, N.; Bruyère, C.; Desban, N.; Oumata, N.; Galons, H.; Roumeliotis, T. I.; Giannopoulou, E. G.; Grenet, J.; Twitchell, D.; Lahti, J.; Mouchet, N.; Galibert, M-D; Garbis, S. D.; Meijer, L. (2013): CDK/CK1 inhibitors roscovitine and CR8 downregulate amplified MYCN in neuroblastoma cells. In: *Oncogene (online Publikation)*.
- Easton, J.; Wei, T.; Lahti, J. M.; Kidd, V. J. (1998): Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. In: *Cancer Res* 58 (12), S. 2624–2632.
- El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (4), S. 817–825.
- Emanuel, S. (2005): The In vitro and In vivo Effects of JNJ-7706621: A Dual Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases and Aurora Kinases. In: *Cancer Research* 65 (19), S. 9038–9046.
- Eschenburg, G.; Eggert, A.; Schramm, A.; Lode, H. N.; Hundsdoerfer, P. (2012): Smac Mimetic LBW242 Sensitizes XIAP-Overexpressing Neuroblastoma Cells for TNF-Independent Apoptosis. In: *Cancer Research* 72 (10), S. 2645–2656.
- Fridman, Jordan S.; Lowe, Scott W. (2003): Control of apoptosis by p53. In: *Oncogene* 22 (56), S. 9030–9040.

- Garrofé-Ochoa, Xènia; Cosialls, Ana M.; Ribas, Judit; Gil, Joan; Boix, Jacint (2011): Transcriptional modulation of apoptosis regulators by roscovitine and related compounds. In: *Apoptosis* 16 (7), S. 660–670.
- Gavet, O.; Pines, J. (2010): Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. In: *The Journal of Cell Biology* 189 (2), S. 247–259.
- George, Rani E.; Sanda, Takaomi; Hanna, Megan; Fröhling, Stefan; Il, William Luther; Zhang, Jianming; Ahn, Yebin; Zhou, Wenjun; London, Wendy B.; McGrady, Patrick; Xue, Liquan; Zozulya, Sergey; Gregor, Vlad E.; Webb, Thomas R.; Gray, Nathanael S.; Gilliland, D. Gary; Diller, Lisa; Greulich, Heidi; Morris, Stephan W.; Meyerson, Matthew; Look, A. Thomas (2008): Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. In: *Nature* 455 (7215), S. 975–978.
- Philomena George: p53 How crucial is its role in cancer. In: *Int J Curr Pharm Res* 2011 (3), S. 19–25.
- Goga, Andrei; Yang, Dun; Tward, Aaron D.; Morgan, David O.; Bishop, J. Michael (2007): Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. In: *Nat Med* 13 (7), S. 820–827.
- Hagting, A.; Karlsson, C.; Clute, P.; Jackman, M.; Pines, J. (1998): MPF localization is controlled by nuclear export. In: *EMBO J* 17 (14), S. 4127–4138.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674.
- Haupt, S. (2003): Apoptosis - the p53 network. In: *Journal of Cell Science* 116 (20), S. 4077–4085.
- Henssen, Anton; Thor, Theresa; Odersky, Andrea; Heukamp, Lukas; El-Hindy, Nicolai; Beckers, Anneleen; Speleman, Frank; Althoff, Kristina; Schäfers, Simon; Schramm, Alexander; Sure, Ulrich; Fleischhack, Gudrun; Eggert, Angelika; Schulte, Johannes H. (2013): BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. In: *Oncotarget* 4 (11), S. 2080–2095.
- Hinds, P. W.; Dowdy, S. F.; Eaton, E. N.; Arnold, A.; Weinberg, R. A. (1994): Function of a human cyclin gene as an oncogene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (2), S. 709–713.
- Hoefnagel, C. A. (1994): Metaiodobenzylguanidine and somatostatin in oncology: role in the management of neural crest tumours. In: *Eur J Nucl Med* 21 (6), S. 561–581.

- Hoffmann, Thomas K.; Trellakis, Sokratis; Okulicz, Kornelia; Schuler, Patrick; Greve, Jens; Arnolds, Judith; Bergmann, Christoph; Bas, Murat; Lang, Stephan; Lehnerdt, Götz; Brandau, Sven; Mattheis, Stefan; Scheckenbach, Kathrin; Finn, Oliviera J.; Whiteside, Theresa L.; Sonkoly, Enikö (2011): Cyclin B1 expression and p53 status in squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Anticancer Res* 31 (10), S. 3151–3157.
- Hörmann, M. (2008): Neuroblastom im Kindesalter. In: *Radiologe* 48 (10), S. 940–945.
- Kaatsch P. und Spix C. (2013): Deutsches Kinderkrebsregister-Jahresreport 2012. Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Kang, Jian; Sergio, C. Marcelo; Sutherland, Robert L.; Musgrove, Elizabeth A. (2014): Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. In: *BMC Cancer* 14:32.
- Kim, S. J.; Nakayama, S.; Miyoshi, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Matsushima, T.; Torikoshi, Y.; Tanaka, S.; Yoshida, T.; Ishihara, H.; Noguchi, S. (2007): Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. In: *Annals of Oncology* 19 (1), S. 68–72.
- Knudsen, E. S.; Wang, J. Y. (1996): Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. In: *J. Biol. Chem* 271 (14), S. 8313–8320.
- Kojima, Kensuke; Shimanuki, Masaya; Shikami, Masato; Andreeff, Michael; Nakakuma, Hideki (2009): Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and mitochondrial apoptosis in AML. In: *Cancer Science* 100 (6), S. 1128–1136.
- Kreis, N. N.; Sanhaji, M.; Krämer, A.; Sommer, K.; Rödel, F.; Strebhardt, K.; Yuan, J. (2010): Restoration of the tumor suppressor p53 by downregulating cyclin B1 in human papillomavirus 16/18-infected cancer cells. In: *Oncogene* 29 (41), S. 5591–5603.
- Kwon, Y. G.; Lee, S. Y.; Choi, Y.; Greengard, P.; Nairn, A. C. (1997): Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (6), S. 2168–2173.
- Landry, B. D.; Mapa, C. E.; Arsenault, H. E.; Poti, K. E.; Benanti, J. A. (2014): Regulation of a transcription factor network by Cdk1 coordinates late cell cycle gene expression. In: *The EMBO Journal* 33 (9), S. 1044–1060.
- Lapenna, Silvia; Giordano, Antonio (2009): Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. In: *Nat Rev Drug Discov* 8 (7), S. 547–566.

- Li, Jia-Qing; Kubo, Akihito; Wu, Fei; Usuki, Hisashi; Fujita, Jiro; Bandoh, Shuji; Masaki, Tsutomu; Saoo, Kousuke; Takeuchi, Hijiri; Kobayashi, Shoji; Imaida, Katsumi; Maeta, Hajime; Ishida, Toshihiko; Kuriyama, Shigeki (2003): Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. In: *Int. J. Oncol* 22 (5), S. 1101–1110.
- Liu, P.; Kao, T. P.; Huang, H. (2008): CDK1 promotes cell proliferation and survival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor. In: *Oncogene* 27 (34), S. 4733–4744.
- Lolli, Graziano; Johnson, Louise N. (2005): CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? In: *Cell Cycle* 4 (4), S. 572–577.
- London, W. B.; Castel, V.; Monclair, T.; Ambros, P. F.; Pearson, A. D. J.; Cohn, S. L.; Berthold, F.; Nakagawara, A.; Ladenstein, R. L.; Iehara, T.; Matthay, K. K. (2011): Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. In: *Journal of Clinical Oncology* 29 (24), S. 3286–3292.
- Löschmann, Nadine; Michaelis, Martin; Rothweiler, Florian; Zehner, Richard; Cinatl, Jaroslav; Voges, Yvonne; Sharifi, Mohsen; Riecken, Kristoffer; Meyer, Jochen; Deimling, Andreas von; Fichtner, Iduna; Ghafourian, Taravat; Westermann, Frank; Cinatl, Jindrich (2013): Testing of SNS-032 in a Panel of Human Neuroblastoma Cell Lines with Acquired Resistance to a Broad Range of Drugs. In: *Translational Oncology* 6 (6), S. 685–696.
- Lu, W.; Chen, L.; Peng, Y.; Chen, J. (2001): Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. In: *Oncogene* 20 (25), S. 3206–3216.
- Manfredi, J. J. (2010): The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. In: *Genes & Development* 24 (15), S. 1580–1589.
- Maris, J. M.; Matthay, K. K. (1999): Molecular biology of neuroblastoma. In: *J. Clin. Oncol* 17 (7), S. 2264–2279.
- Maris, John M. (2010): Recent advances in neuroblastoma. In: *N. Engl. J. Med* 362 (23), S. 2202–2211.
- Mats Ljungman und Michelle T. Paulsen (2001): The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine Inhibits RNA Synthesis and Triggers Nuclear Accumulation of p53 That Is Unmodified at Ser15 and Lys382. In: *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 60 (4), S. 785–789.
- McDonald, E. R.; El-Deiry, W. S. (2000): Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). In: *Int. J. Oncol* 16 (5), S. 871–886.

- Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. (1997): Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. In: *Eur. J. Biochem* 243 (1-2), S. 527–536.
- Molenaar, Jan J.; van Sluis, Peter; Boon, Kathy; Versteeg, Rogier; Caron, Huib N. (2003): Rearrangements and increased expression of cyclin D1 (CCND1) in neuroblastoma. In: *Genes Chromosom. Cancer* 36 (3), S. 242–249.
- Molenaar, Jan J.; Ebus, Marli E.; Geerts, Dirk; Koster, Jan; Lamers, Fieke; Valentijn, Linda J.; Westerhout, Ellen M.; Versteeg, Rogier; Caron, Huib N. (2009): Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106 (31), S. 12968–12973.
- Moore, Nathan F.; Azarova, Anna M.; Bhatnagar, Namrata; Ross, Kenneth N.; Drake, Lauren E.; Frumm, Stacey; Liu, Qinsong S.; Christie, Amanda L.; Sanda, Takaomi; Chesler, Louis; Kung, Andrew L.; Gray, Nathanael S.; Stegmaier, Kimberly; George, Rani E. (2014): Molecular rationale for the use of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in combination with crizotinib in ALK-mutated neuroblastoma. In: *Oncotarget* (online Publikation)
- Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation. In: *Nature* 374 (6518), S. 131–134.
- Morgan, D. O. (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 13, S. 261–291.
- Mossé, Yaël P.; Laudenslager, Marci; Longo, Luca; Cole, Kristina A.; Wood, Andrew; Attiyeh, Edward F.; Laquaglia, Michael J.; Sennett, Rachel; Lynch, Jill E.; Perri, Patrizia; Laureys, Geneviève; Speleman, Frank; Kim, Cecilia; Hou, Cuiping; Hakonarson, Hakon; Torkamani, Ali; Schork, Nicholas J.; Brodeur, Garrett M.; Tonini, Gian P.; Rappaport, Eric; Devoto, Marcella; Maris, John M. (2008): Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. In: *Nature* 455 (7215), S. 930–935.
- Motokura, T.; Arnold, A. (1993): Cyclins and oncogenesis. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1155 (1), S. 63–78.
- Padmakumar, V. C.; Aleem, E.; Berthet, C.; Hilton, M. B.; Kaldis, P. (2009): Cdk2 and Cdk4 Activities Are Dispensable for Tumorigenesis Caused by the Loss of p53. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (10), S. 2582–2593.
- Prof. Dr med. Rübben (Hg.) (2009): Uroonkologie. Auflage 5. Kapitel 30 Neuroblastom S. 771-778. Heidelberg. Online verfügbar unter 978-3-642-01382-9.
- Ren, Shengjun; Rollins, Barrett J. (2004): Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. In: *Cell* 117 (2), S. 239–251.

Rosenthal, Christina Karlsson (2014): Cdk1 boosts mitochondrial energy production. In: *Nat Cell Biol* 16 (6), S. 511.

Santamaría, David; Barrière, Cédric; Cerqueira, Antonio; Hunt, Sarah; Tardy, Claudine; Newton, Kathryn; Cáceres, Javier F.; Dubus, Pierre; Malumbres, Marcos; Barbacid, Mariano (2007): Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. In: *Nature* 448 (7155), S. 811–815.

Schulte, Johannes H.; Horn, Sebastian; Otto, Tobias; Samans, Birgit; Heukamp, Lukas C.; Eilers, Ursula-Christa; Krause, Michael; Astrahantseff, Kathy; Klein-Hitpass, Ludger; Buettner, Reinhard; Schramm, Alexander; Christiansen, Holger; Eilers, Martin; Eggert, Angelika; Berwanger, Bernd (2008): MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. In: *Int. J. Cancer* 122 (3), S. 699–704.

Schweigerer, L.; Breit, S.; Wenzel, A.; Tsunamoto, K.; Ludwig, R.; Schwab, M. (1990): Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. In: *Cancer Res* 50 (14), S. 4411–4416.

Seeger, Robert C.; Brodeur, Garrett M.; Sather, Harland; Dalton, Andree; Siegel, Stuart E.; Wong, Kwan Y.; Hammond, Denman (1985): Association of Multiple Copies of the N- myc Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas. In: *N Engl J Med* 313 (18), S. 1111–1116.

Sherr, C. J.; Roberts, J. M. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. In: *Genes & Development* 9 (10), S. 1149–1163.

Toyoshima, F.; Moriguchi, T.; Wada, A.; Fukuda, M.; Nishida, E. (1998): Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. In: *EMBO J* 17 (10), S. 2728–2735.

Tweddle, Deborah A.; Pearson, Andrew D.J.; Haber, Michelle; Norris, Murray D.; Xue, Chengyuan; Flemming, Claudia; Lunec, John (2003): The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. In: *Cancer Letters* 197 (1-2), S. 93–98.

van Maerken, T.; Speleman, F.; Vermeulen, J.; Lambertz, I.; Clercq, S. de; Smet, E. de; Yigit, N.; Coppens, V.; Philippe, J.; Paepe, A. de; Marine, J.-C; Vandesompele, J. (2006): Small-Molecule MDM2 Antagonists as a New Therapy Concept for Neuroblastoma. In: *Cancer Research* 66 (19), S. 9646–9655.

Vassilev, Lyubomir T.; Tovar, Christian; Chen, Shaoqing; Knezevic, Dejan; Zhao, Xiaolan; Sun, Hongmao; Heimbroke, David C.; Chen, Li (2006): Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (28), S. 10660–10665.

- Verissimo, C. S.; Molenaar, J. J.; Fitzsimons, C. P.; Vreugdenhil, E. (2011): Neuroblastoma therapy: what is in the pipeline? In: *Endocrine Related Cancer* 18 (6), S. R213.
- Vermeulen, Katrien; van Bockstaele, Dirk R.; Berneman, Zwi N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. In: *Cell Prolif* 36 (3), S. 131–149.
- Villerbu, Nathalie; Gaben, Anne-Marie; Redeuilh, Gérard; Mester, Jan (2002): Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. In: *Int. J. Cancer* 97 (6), S. 761–769.
- Wang, Zhaoqing; Fan, Ming; Candas, Demet; Zhang, Tie-Qiao; Qin, Lili; Eldridge, Angela; Wachsmann-Hogiu, Sebastian; Ahmed, Kazi M.; Chromy, Brett A.; Nantajit, Danupon; Duru, Nadire; He, Fuchu; Chen, Min; Finkel, Toren; Weinstein, Lee S.; Li, Jian Jian (2014): Cyclin B1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell-Cycle G2/M Progression. In: *Developmental Cell* 29 (2), S. 217–232.
- Weinstein, I. B.; Joe, A.; Felsher, D. (2008): Oncogene Addiction. In: *Cancer Research* 68 (9), S. 3077–3080.
- Yamamoto, H.; Monden, T.; Miyoshi, H.; Izawa, H.; Ikeda, K.; Tsujie, M.; Ohnishi, T.; Sekimoto, M.; Tomita, N.; Monden, M. (1998): Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells. In: *Int. J. Oncol* 13 (2), S. 233–239.
- Yan, Hong Hua; Jung, Kyung Hee; Son, Mi Kwon; Fang, Zhenghuan; Kim, Soo Jung; Ryu, Ye-Lim; Kim, Juyoung; Kim, Mi-Hyun; Hong, Soon-Sun (2014): Crizotinib exhibits antitumor activity by targeting ALK signaling not c-MET in pancreatic cancer. In: *Oncotarget (online Publikation)*.
- Yang, J.; Bardes, E. S.; Moore, J. D.; Brennan, J.; Powers, M. A.; Kornbluth, S. (1998): Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. In: *Genes Dev* 12 (14), S. 2131–2143.
- Yasui, W.; Ayhan, A.; Kitadai, Y.; Nishimura, K.; Yokozaki, H.; Ito, H.; Tahara, E. (1993): Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. In: *Int. J. Cancer* 53 (1), S. 36–41.
- Yuan, Juping; Yan, Ruilan; Krämer, Andrea; Eckerdt, Frank; Roller, Marc; Kaufmann, Manfred; Strebhardt, Klaus (2004): Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. In: *Oncogene* 23 (34), S. 5843–5852.
- Zheng, X.; He, K.; Zhang, L.; Yu, J. (2013): Crizotinib Induces PUMA-Dependent Apoptosis in Colon Cancer Cells. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (5), S. 777–786.

Zhu, X. (1996): Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. In: *The Journal of Cell Biology* 133 (2), S. 391–403.

10. Anhang

10.1 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, PD Dr. Schramm, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in diesem spannenden Gebiet der onkologischen Forschung anzufertigen. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass er mir während der ganzen Promotionsphase beratend zur Seite stand und mir dennoch die Möglichkeit gegeben hat, mein Projekt selbständig und eigenverantwortlich zu planen und durchzuführen.

Verfasst wurde diese Arbeit im Rahmen des SFB876, deshalb geht auch an diese Stelle ein großes Dankeschön. Vor allem an die Sprecherin des SFB876, Frau Prof. Dr. Morik, die den Doktoranden ein lehrreiches und vielseitiges Rahmenprogramm ermöglicht hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn PD Dr. Schramm und Herrn Prof. Dr. Schulte, die immer einen guten Rat parat hatten und mich wo es nur ging, unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht hierbei an Anja Rieb, Sabine Dreesmann und Andrea Odersky. Herrn Dr. Stephan möchte ich danken für die Hilfe bei der Erstellung meiner Abbildungen für das Paper.

Des Weiteren danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann für die Unterstützung und Rücksichtnahme während meiner Promotion.

10.2 Publikationen

Lee, Sangkyun; Rahnenführer, Jörg; Lang, Michel; Preter, Katleen de; Mestdagh, Pieter; Koster, Jan; Versteeg, Rogier; Stallings, Raymond L.; Varesio, Luigi; Asgharzadeh, Shahab; Schulte, Johannes H.; Fielitz, Kathrin; **Schwermer, Melanie**; Morik, Katharina; Schramm, Alexander; (2014): Robust Selection of Cancer Survival Signatures from High-Throughput Genomic Data Using Two-Fold Subsampling. In: PLoS ONE 9 (10), S. e108818.

Schramm, Alexander; Köster, Johannes; Marschall, Tobias; Martin, Marcel; **Schwermer, Melanie**; Fielitz, Kathrin; Büchel, Gabriele; Barann, Matthias; Esser, Daniela; Rosenstiel, Philip; Rahmann, Sven; Eggert, Angelika; Schulte, Johannes H. (2013): Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma. In: Int. J. Cancer 132 (3), S. E106-E115.

Schramm, A.; Schowe, B.; Fielitz, K.; **Heilmann, M.**; Martin, M.; Marschall, T.; Köster, J.; Vandesompele, J.; Vermeulen, J.; Preter, K. de; Koster, J.; Versteeg, R.; Noguera, R.; Speleman, F.; Rahmann, S.; Eggert, A.; Morik, K.; Schulte, J. H. (2012): Exon-level expression analyses identify MYCN and NTRK1 as major determinants of alternative exon usage and robustly predict primary neuroblastoma outcome. In: Br J Cancer 107 (8), S. 1409–1417.

10.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10.3 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Molekulare Analyse des cdk1/CCNB1 Komplexes und Charakterisierung von cdk-Inhibitoren im Neuroblastom*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Melanie Schwermer befürworte.

Essen, den 21.Oktober 2014

PD Dr. Alexander Schramm

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 21.Oktober 2014

Melanie Schwermer

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 21. Oktober 2014

Melanie Schwermer